

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE PACIENTES CON
FEOCROMOCITOMA/PARAGANGLIOMA Y
PERFILES DE EXPRESIÓN ASOCIADOS CON
LAS DISTINTAS CLASES GENÉTICAS
DE TUMORES**

Tesis doctoral que presenta para optar al título de
Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid
la Licenciada en Biología
M^a Elena López Jiménez

Co-Directores de Tesis

Dr. Alberto Cascón Soriano

Dra. Mercedes Robledo Batanero

Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario

Programa de Genética del Cáncer Humano

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON
FEOCROMOCITOMA/PARAGANGLIOMA Y PERFILES DE
EXPRESIÓN ASOCIADOS CON LAS DISTINTAS
CLASES GENÉTICAS DE TUMORES.

TESIS DOCTORAL

M^A ELENA LÓPEZ JIMÉNEZ

Madrid, 2009

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS

Programa de Genética del Cáncer Humano

Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario

Directores:

Dra. Mercedes Robledo Batanero

Dr. Alberto Cascón Soriano



Dña. Mercedes Robledo, Jefa del Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y Profesora Honoraria del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, como Co-Directora y Tutora,

CERTIFICA:

Que Doña M^a Elena López Jiménez, Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, ha llevado a cabo la Tesis Doctoral titulada: **“Caracterización molecular de pacientes con Feocromocitoma/Paraganglioma y perfiles de expresión asociados con las distintas clases genéticas de tumores”**, y que a su juicio reúne todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctora en Biología**, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo referido ha sido realizado bajo su dirección, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste se extiende el presente certificado,

Madrid, Noviembre 2009.

V^o B^o de la Co-Directora y Tutora de la Tesis:

Mercedes Robledo Batanero



D. Alberto Cascón, Investigador del Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), como Co-Director,

CERTIFICA:

Que Doña M^a Elena López Jiménez, Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla, ha llevado a cabo la Tesis Doctoral titulada: **“Caracterización molecular de pacientes con Feocromocitoma/Paraganglioma y perfiles de expresión asociados con las distintas clases genéticas de tumores”**, y que a su juicio reúne todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctora en Biología**, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo referido ha sido realizado bajo su dirección, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste se extiende el presente certificado,

Madrid, Noviembre 2009.

Vº Bº del Co-Director:

Alberto Cascón Soriano

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), bajo la supervisión de Alberto Cascón Soriano y Mercedes Robledo Batanero.

Las siguientes ayudas han permitido la realización de la presente tesis doctoral:

- Proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias PI061477.
- Proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias PI080883.
- Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación INTRA-706-2 ISCIII CIBER-ER.
- Proyecto de la Fundación Mutua Madrileña AP2775/2008.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON
FEOCROMOCITOMA/PARAGANGLIOMA Y PERFILES DE
EXPRESIÓN ASOCIADOS CON LAS DISTINTAS
CLASES GENÉTICAS DE TUMORES.

AGRADECIMIENTOS

Tengo mucho que agradecer, y a pesar de todo lo que hablo normalmente, ahora me cuesta definir lo que han sido para mí estos años de tesis en Madrid. No sé como empezar...

Me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, sin los cuales todo este trabajo no hubiera sido posible. Gracias Meme por darme la oportunidad de estar en tu grupo, aprendiendo día a día, y en un entorno personal que a muchos les gustaría poder tener, nos cuidas y nos ofreces generosamente tu tiempo a todos y cada uno de nosotros, y eso creo que queda reflejado en lo que hacemos. A ti Alberto, que me elegiste para trabajar contigo, que hemos compartido tantas alegrías y preocupaciones a lo largo de estos tres años, y tanto esfuerzo, no siempre recompensado. Por tu inestimable ayuda y dedicación en todos los momentos de este trabajo, por enseñarme muchas cosas de ciencia que nunca olvidaré, aunque sé que no siempre parece que te haga caso, pero te escucho y queda todo grabado. Muchas gracias! A Javier Benitez, por dirigir el programa de Genética del Cáncer Humano, haciendo siempre que nos sintámos tan a gusto y por crear tan buen ambiente entre todos nosotros.

Cuando llegué a Madrid venía con la ilusión de aprender lo que era el mundo de la investigación en oncología y con algo de suerte poder hacer mi pequeña contribución en alguno de los temas que se estuvieran tratando. Comencé esta aventura en el Hospital 12 de Octubre, donde tuve grandes compañeros, que acabaron siendo amigos, entre los que tengo que destacar a mi “hermanita madrileña”, Laura, con la que he compartido todas las alegrías y las penas en estos más de cuatro años. A ti Laura, te agradezco el que siempre estés ahí, que me cuides y me des cariño incondicional, que creas en mí y me ayudes a afrontar tantas y tantas situaciones difíciles. Eres muy importante para mí y lo seguirás siendo, esto no acaba aquí!

Al llegar al CNIO, todo lo que conocía hasta el momento cambió, gente nueva, grupo y trabajo nuevo...Me encontré integrada en el grupo de Cáncer Endocrino Hereditario, que ha ido creciendo desde entonces, con mis compañeros, que me han aguantado y espero que a ratos disfrutado, en este tiempo: Iñigo alias “Iñaki” (nos hemos reído, hemos viajado y me has ayudado cuando te he necesitado), Susanna (gracias por tu ayuda con tantas cosas y por compartir charlas que nadie más puede comprender), Cristina Montero (a la que ya no tenemos con nosotros pero que me enseñó gran parte de lo que sé del mundo de los “arrays” y que me cogió de la mano cuando aún no sabía caminar por un entorno tan diferente como es el CNIO), Javi (que gran persona

eres, llenas el laboratorio de alegría y optimismo, haces falta, gracias por toda tu ayuda), Cristina Rodríguez (eres un ángel, siempre que te he necesitado has estado ahí, muchas veces sin ni siquiera pedírtelo, te lo agradezco enormemente, sigue siendo así, no cambies), Leti (mi hermanita pequeña, vaya últimos meses que hemos pasado las dos, espero que a partir de ahora las cosas vayan a mejor), Lucía (me has animado y apoyado en muchos malos momentos, espero haber podido hacer lo mismo contigo, sabes que estaré aquí), Rocío (nos alegras a todos cada día) y a las recientes incorporaciones, Aga y Aguirre.

A todos mis compañeros de los laboratorios vecinos 206-208, CEGEN, citogenética y epidemiología, sois tantos que si me pusiera a nombraros uno a uno creo que no terminaría. Me habéis ayudado en un montón de cosas y siempre con mucho interés y dedicación. Tengo que destacar sobre todo a Bibiana, Laura, Iván, Ali y Fer, Toya, María, Ana Osorio, Magda, Francesco, Dani, Tais y los que seguro que se me olvidan, que lata os he dado tantos y tantos días, muchas gracias. Quisiera hacer especial mención a Guada (de genómica), he aprendido un montón de ti, me enseñaste a hacer mis primeros *arrays* con infinita paciencia y una sonrisa siempre en la cara, me has ofrecido tu ayuda más allá de lo profesional en momentos que han sido muy difíciles para mí, y eso es de agradecer, no se me va a olvidar nunca.

A mis “bio-frikis” (aunque reneguéis de ello): Gonzalo G (cuanto me has enseñado y ayudado) y Dani, Víctor y Txema, José Manuel y Willy, y a David, (fiki incomparable), por los buenos momentos que me habéis dado todos los días compartiendo el almuerzo, no sabéis todo lo que he aprendido escuchando vuestras conversaciones, que a veces me suenan a “chino”, pero con las que al final siempre acabo riéndome. Junto a ellos, también agradecerle a Bea su amistad, sus ánimos y su optimismo frente a todo, sus enseñanzas en el laboratorio, esas comidas juntas.

Cómo olvidarme del grupo “pendin”: Ricardo, mi hermanito pequeño venido de Brasil, mi compañero de piso, mi amigo, uno de mis grandes apoyos. Qué de cosas hemos compartido y que de alegrías entre ellas. Sabes que me importas, no hace falta que te lo diga. Juanma, mejor dicho “Ros”, con qué mal pie empezamos tú y yo y como pueden cambiar las cosas, por suerte he podido conocerte tal y como eres, eso que a poca gente le dejas, y sabes que te aprecio y te tengo muchísimo cariño. Loren, aunque tarde, me alegra haberte podido conocer y disfrutar (nos vemos por Londres). Espero que todos sigamos viéndonos y quedando, estemos donde estemos. “How big you are!”

A mi amiga inseparable Cristina, que hubiera hecho yo sin ti... Gracias por tu generosidad y tu humildad, por levantarme cuando me he caído. Te debo mucho.

Gabrielete, pese a estos años de distanciamiento, siempre puedo contar contigo, me das apoyo y cariño en la distancia, y has tenido la paciencia de mantener y cuidar nuestra amistad en estas circunstancias, que no son las mejores. Gracias por quererme!

Tres de las personas más importantes en este último año y pico son mis mis "niños", a vosotros no soy capaz de definir lo que significáis para mí. Ángel, eres mi alegría desde que llego a trabajar por la mañana, qué suerte haberte conocido, creo que existen pocas personas como tú, eres y serás mi gran amigo. Edu, que puedo decir de ti, eres como yo en muchas cosas, sé que entiendes mis pensamientos y preocupaciones, te haces necesario, espero que sigas cerca. Gonzalo L, "sin palabras", tú ya sabes lo que pienso, gracias por querer compartir tu tiempo conmigo y darme alegrías. Os quiero mucho! Sois los mejores!!

Una de las personas más importantes, y que no puedo olvidar en este momento, es Alfonso. Contigo empecé toda esta experiencia, has estado a mi lado, y eres el único que siempre y sin dudarlo ha creído en mí, en lo personal y en mi trabajo, me lo has dado todo y sigues haciéndolo. Nunca podré agradecerte lo suficiente tu apoyo incondicional. Eres muy importante para mí. Gracias por quererme y enseñarme tanto.

A mi familia, que aceptó que me fuera hace ya algunos años. A mis hermanos, Alberto y Clara, no sabéis cuanto os he echado de menos, me hubiera gustado estar ahí con vosotros, veros crecer y evolucionar, compartir vuestros problemas diarios, y no he podido tanto como hubiera querido. Gracias por vuestra comprensión y vuestro cariño. A mi madre, me has enseñado a luchar por lo que quiero y a no rendirme, a afrontar situaciones muy difíciles como las que hemos pasado juntas, si he llegado hasta aquí, es gracias a ti, te lo debo todo y más. A mi abuelo, me hubiera encantado que pudieras ver esto, y que supieras que parte del mérito de todo es tuyo también, has sido la mejor persona que he conocido, me has enseñado gran parte de los valores que tengo, qué gran privilegio haber compartido gran parte de mi vida contigo. A mi padre, por haberme apoyado en todo lo que hago, por creer siempre que puedo conseguir las cosas que me propongo y darme tu cariño. Gracias de corazón a todos. Ya sabéis todo lo que os quiero!

En definitiva, a todos los que me han hecho día a día sentirme como si estuviera en mi casa y me han hecho disfrutar de estos años de tesis, con sus alegrías y sus momentos duros. He aprendido mucho de todos y cada uno de vosotros, y espero seguir haciéndolo. GRACIAS!

No puedo acabar este apartado sin agradecer a todas aquellas personas que generosamente han cedido parte de ellos para el avance de la investigación en esta y otras enfermedades, en esos momentos tan duros y difíciles como es el padecer una enfermedad de esta índole,. A todos ellos muchas gracias por su altruismo.

En estos años de investigación he tenido tiempo de crecer y darme cuenta de muchas cosas de las que me rodean, he aprendido lo bonito y duro que puede ser este mundo, que nada (o muy poco) es cuestión de suerte, si no de trabajo, y lo más importante de todo, es tener personas que te quieren y te cuidan día a día, vayas donde vayas. Mi más sincero agradecimiento a todos.

Elena

*A mis padres y hermanos.
A mi abuelo.*

Por todo vuestro cariño y apoyo.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICES	23
ÍNDICE GENERAL	25
ÍNDICE DE TABLAS	28
ÍNDICE DE FIGURAS	29
 ABREVIATURAS	 31
 RESUMEN/ABSTRACT	 35
 INTRODUCCIÓN	 41
1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD	43
1.1. Historia	43
1.2. Presentación clínica	44
1.3. Epidemiología	45
2. DIAGNÓSTICO	46
2.1. Test bioquímico: detección de catecolaminas	46
2.2. Evaluación mediante imagen	48
2.3. Valoración inmunohistoquímica	49
3. TRATAMIENTO	49
4. GENÉTICA	50
4.1. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2 (MEN2)	51
4.2. Enfermedad de Von Hippel-Lindau	53
4.3. Síndromes Paraganglionares	54
4.3.1. PGL1	55
4.3.2. PGL2	55
4.3.3. PGL3	56
4.3.4. PGL4	56
4.4. PCC Familiar	57
4.5. Otros síndromes asociados	57
4.5.1. Neofibromatosis Tipo 1	57
4.5.2. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1 (MEN1)	58
4.5.3. Síndrome de Carney-Stratakis	58
4.6. PCC Esporádico	58
4.7. Diagnóstico y consejo genético	59
5. GENÓMICA	60
 OBJETIVOS	 63
 MATERIAL Y MÉTODOS	 67
1. MUESTRAS	69
1.1. Pacientes	69
1.2. Tejidos congelados	69
1.3. Tejidos embebidos en parafina	70
2. EXTRACCIÓN DE ADN	71
2.1. A partir de sangre periférica	71
2.2. A partir de tejido congelado	73
2.3. A partir de muestras embebidas en parafina	74
3. EXTRACCIÓN DE ARN	74
3.1. A partir de tejido congelado	74
3.2. A partir de tejido embebido en parafina	75
3.3. Análisis de la integridad del ARN	77
4. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES	77

4.1. Amplificación por PCR	78
4.2. Purificación de los fragmentos amplificados	79
4.3. Secuenciación de los fragmentos purificados	79
4.4. Análisis de grandes deleciones	80
4.5. Estudio de haplotipos	83
5. PERFILES DE EXPRESIÓN DE TUMORES	84
5.1. Amplificación, marcaje e hibridación del ARN	85
5.2. Obtención de imágenes del microarray	89
5.3. Análisis de datos	89
5.3.1. Extracción de datos de la imagen	89
5.3.2. Normalización	89
5.3.3. Preprocesado de datos	90
5.3.4. Agrupamiento No Supervisado	91
5.3.5. Análisis Supervisado	92
5.3.6. Análisis Funcional	92
5.3.7. Identificación de una firma molecular asociada con pronóstico mediante la aplicación de un predictor	93
5.3.8. Validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	94
5.3.9. Estudios de metilación	96
5.3.10. Inmunohistoquímica	97
RESULTADOS	99
Resultados Bloque I	101
1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PACIENTES: ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL FENOTIPO	103
1.1. Pacientes síndrómicos	103
1.2. Pacientes no síndrómicos	105
1.2.1. Casos con antecedentes familiares de PCC/PGL	106
1.2.2. Casos “aparentemente esporádicos”	108
1.3. Estudio de haplotipos	109
Resultados Bloque II	111
2. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS TUMORES	113
2.1. Caracterización genética de los tumores	113
2.2. Agrupamiento de los tumores según su perfil global de expresión	113
2.3. Diferencias transcripcionales entre los clusters VHL/SDH y RET/NF1	115
2.4. Perfil transcripcional de acuerdo a la expresión de genes “diana” de HIF	116
2.5. Diferencias entre los tumores VHL y SDHB	117
2.6. Diferente expresión de los genes dependientes de HIF al comparar los tumores VHL y SDHB	119
2.7. Diferencias transcripcionales entre los tumores con distintas mutaciones en los SDH	120
2.8. Cluster 1: Diferencias transcripcionales entre las diferentes clases de tumores con localización en cabeza y cuello	122
2.9. Cluster 2: Diferencias de expresión entre los tumores RET y los esporádicos	123
2.10. Perfil transcripcional asociados a tumores metastáticos: construcción de un predictor	124
2.11. Perfil transcripcional de los casos familiares sin mutación (FPCC)	127
2.12. Validación de los resultados mediante RT-qPCR	128
2.13. Expresión de EglN3	129
2.14. Hiper-metilación del promotor de EglN3	130

DISCUSIÓN	131
Discusión Bloque I	133
1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON PCCs/PGLs EN POBLACIÓN ESPAÑOLA	135
1.1. Pacientes sindrómicos (MEN2 y VHL)	135
1.2. Pacientes no sindrómicos	136
1.2.1. Casos con antecedentes familiares	137
1.2.2. Casos sin antecedentes familiares	138
Discusión Bloque II	145
2. PERFILES DE EXPRESIÓN DE UNA SERIE DE PCCs/PGLs	147
2.1. La distribución transcripcional de los PCCs/PGLs depende de su firma hipóxica	147
2.2. Los tumores VHL y SDHB presentan perfiles de expresión significativamente diferentes	148
2.3. La desregulación de HIF-1 α diferencia los tumores VHL de los SDHB	149
2.4. La sobre-expresión de EglN3 constituye un marcador para los PCCs VHL	150
2.5. La sobre-expresión de BNIP3 es específica de los PCCs VHL	153
2.6. El Ciclo de Krebs diferencia los tumores SDHB de los SDHC/D	153
2.7. Los PGLs de cabeza y cuello tienen un perfil homogéneo, independiente del estatus genético	154
2.8. Los PCCs esporádicos tienen un perfil transcripcional muy similar al de los tumores RET	154
2.9. El predictor de malignidad presentó una alta tasa de error	154
2.10. La homogeneidad de los FPCC2 sugiere la implicación de un único gen en estos casos	155
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO	173
ANEXO II: PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	183
ANEXO III: OTRAS PUBLICACIONES DEL DOCTORANDO	207

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características genéticas y clínicas asociadas con los 6 síndromes relacionados con PCCs (Adaptado de Neumann y Eng, 2009 [2]).

Tabla 2. Secuencia de los *primers* empleados para la amplificación del ADN modificado. Fm y Rm, primers directo y reverso para la secuencia metilada; Fu y Ru, primers directo y reverso para la secuencia no metilada.

Tabla 3. Características clínicas y genéticas de los casos síndrómicos.

Tabla 4. Características clínicas y genéticas de los casos no síndrómicos con mutación.

Tabla 5. Resultado del estudio de haplotipos en las cuatro mutaciones estudiadas.

Tabla 6. Tabla de resultados significativos extraídos de la comparación VHL/SDH vs RET/NF1 obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES muestra las rutas sobrerrepresentadas en VHL/SDH y el signo negativo, las sobrerrepresentadas en RET/NF1.

Tabla 7. Tabla de resultados significativos de la comparación VHL *versus* SDHB obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES s las rutas sobrerrepresentadas en VHL y con signo negativo, las sobrerrepresentadas en SDHB.

Tabla 8. Tabla de resultados significativos de la comparación SDHB *versus* SDHC-D obtenidos mediante GSEA. Con signo positivo del estadístico NES se encuentran las rutas sobrerrepresentadas en SDHB y con signo negativo, las sobrerrepresentadas en SDHC-D.

Tabla 9. Tabla de resultados significativos de la comparación MALIGNOS *versus* BENIGNOS obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES muestra las rutas sobrerrepresentadas en los casos MALIGNOS y el signo negativo, las sobrerrepresentadas en BENIGNOS.

Tabla 10. Lista de los 15 genes, diferencialmente expresados entre tumores BENIGNOS y MALIGNOS, empleados con mayor frecuencia por los 2 predictores utilizados.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS DEL MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 1MS. Condiciones de las PCRs realizadas para la caracterización molecular realizada tanto de los pacientes como de los tumores.

Tabla 2MS. Secuencia de primers empleados en la PCR-Multiplex. En azul se muestran primers alternativos utilizados en el caso del exón 1 de *SDHB*.

Tabla 3MS. Genes validados mediante RT-qPCR y sus correspondientes sondas de la Librería de Roche.

Tabla 3bMS. Datos clínicos y status genético de los tumores hibridados en el estudio de perfiles de expresión.

Tabla 4MS. Lista de los 50 clones con menor p-val procedentes de la comparación realizada con Pomelo II de las clases SDHC/D *versus* SP de cabeza y cuello (p-val<0,05).

Tabla 5MS. Resultados de la comparación realizada con GSEA en las clases SDHC/D *versus* SP de cabeza y cuello. El signo negativo del NES significa enriquecimiento en la clase SP de cabeza y cuello.

Tabla 6MS. Resultados de GSEA para la comparación RET vs. SP del *cluster* RET/NF1. El signo positivo de NES indica enriquecimiento en la clase RET y el negativo indica enriquecimiento en la clase SP.

Figura 7MS. Mapa mostrando el origen geográfico de las 7 familias con delección del exón 1 de *SDHB* (c.1-10413_73-3866del) detectadas en nuestra serie de pacientes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Distribución Anatómica de los Paraganglios Simpatoadrenales. B) Distribución Anatómica de los Paraganglios de la Cabeza y el Cuello. Adaptado de Lack, 1997 [1].

Figura 2. Esquema de la biosíntesis de catecolaminas.

Figura 3. Representación del perfil generado por el bioanalizador de Agilent. Gráficas de los distintos perfiles de integridad del ARN. Un RIN de 10 representa la máxima integridad, 7 óptima, y finalmente 1 y 3 corresponden a ARN degradado.

Figura 4. Ejemplo de visualización de un ensayo de PCR-Multiplex para el gen *SDHB*, utilizando el software *Peak Scanner* para el análisis de fragmentos. Las flechas indican los exones del gen *SDHB*.

Figura 5. Esquema del proceso de amplificación, marcaje e hibridación para un experimento de *microarray* de dos colores.

Figura 6a. Representación gráfica del proceso de normalización de los datos obtenidos del *microarray*. A) Estado de las muestras previo a la normalización. B) Estado de las muestras tras el proceso de normalización.

Figura 6b. Esquema representativo del análisis de datos de *microarrays*.

Figura 7. Distribución de los 256 casos de nuestra serie dependiendo de: gen mutado, antecedentes sindrómicos y antecedesnte familiares.

Figura 8. Árboles genealógicos de las familias con mutación en los nuevos genes de susceptibilidad: 1) *SDH5*; 2) *TMEM127*.¹

Figura 9. Representación del agrupamiento no supervisado de todos los casos analizados en dos clusters principales: 1) Cluster compuesto principalmente por casos VHL/*SDHB*. 2) Cluster compuesto principalmente por casos RET/NF.

Figura 10. Representación gráfica del *consensus clustering*.

Figura 11. Representación de 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística en la comparación entre los casos VHL/*SDH* y RET/NF1. Figura extraída del programa Pomelo II.

Figura 12. Representación del agrupamiento no supervisado de todos los tumores empleando los genes “diana” de *HIF*.

Figura 13. Representación gráfica extraída del programa Pomelo II de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística entre las clases VHL y *SDHB*.

Figura 14. Representación del agrupamiento no supervisado de los casos VHL y *SDHB* empleando los genes “diana” de *HIF*. La flecha indica los 12 genes que mejor diferencian ambas clases.

Figura 15. Representación de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística entre las clases *SDHB* y *SDHC-D*, extraída del programa Pomelo II.

Figura 16. Representación de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística entre los tumores RET y los casos SP. Figura extraída del programa Pomelo II.

Figura 17. Representación de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística entre los tumores benignos y los malignos. Figura extraída del programa Pomelo II

Figura 18. Representación gráfica del agrupamiento no supervisado de los casos FPCC.

Figura 19. Gráfica representativa de los resultados obtenidos en la validación mediante RT-qPCR de seis de los genes diferencialmente expresados en la comparación VHL vs SDHB.

Figura 20. Representación de la expresión diferencial de *Egln3* en tumores VHL y no-VHL.

Figura 21. Imagen del estudio inmunohistoquímico de *Egln3*: A) Tumor VHL mostrando una tinción negativa para *Egln3*; B) Tumor VHL con tinción positiva para *Egln3*.

Figura 22. Representación de los casos aparentemente esporádicos en función de su localización. A) Localización retroperitoneal-torácica. B) Localización de tumor en cabeza y cuello. C) Localización adrenal. Las líneas discontinuas verticales marcan una edad de 45 años.

Figura 23. Esquema del algoritmo propuesto para la racionalización del test genético en pacientes no sindrómicos con un único tumor.

Figura 24. Representación de la ruta neuronal apoptótica propuesta por Kaelin y col [32, 147].

Figura 25. Modelo de ruta propuesto para el desarrollo de PCC en el caso de mutaciones en VHL o SDH.

ABREVIATURAS

A lo largo del texto de la presente tesis, el lector podrá encontrar una serie de anglicismos que hemos utilizado por su uso regular en el argot científico, si bien algunos de ellos no están admitidos en la lengua oficial en la que está escrita la tesis. A continuación se exponen las abreviaturas y anglicismos más utilizados en la presente tesis:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Array	Matriz
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Enzima que degrada el ARN
ARNc	ARN complementario
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN total
BME	β -mercaptoetanol
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
CRCC	Carcinoma renal de células claras
Cluster/ ing	Grupo/Agrupamiento
CPT	Carcinoma Papilar de Tiroides
CT	Tomografía computerizada
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
FDG	2-Fluoro-D-Desoxiglucosa
FDR	<i>False discovery rate</i>
FFPE	Tejido embebido en parafina (<i>Formalin Fixed Parafine Embed tissue</i>)
FPCC	Feocromocitoma familiar sin mutación
FPGL	Paraganglioma familiar sin mutación
GIST	Tumor del estroma gastrointestinal
GSEA	Programa de enriquecimiento de rutas (<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>)
Hbl	Hemangioblastoma
HIF	Factor inducible por hipoxia (<i>Hypoxia inducible factor</i>)
HIF-1α	HIF subunidad 1 alfa

HIF-2α	HIF subunidad 2 alfa
HPT	Hiperparatiroidismo
H&E	Hematoxilina- Eosina
Imprinting	Impronta
MEN1	Neoplasia endocrina múltiple tipo 1
MEN2	Neoplasia endocrina múltiple tipo 2
MIBG	Escintigrafía con metayodobencilguanidina
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MRI	Resonancia magnética (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MTC	Carcinoma medular de tiroides
NaCl	Cloruro sódico
NF1	Neurofibromatosis tipo1
PCC	Feocromocitoma
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-Multiplex	PCR múltiple
Pellet	Sedimento
PET	Tomografía por emisión de positrones
PGL	Paraganglioma
Primer	Cebador
qPCR	PCR cuantitativa
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RT-qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
Screening	Chequeo, búsqueda.
SD	Desviación estandar
SDH	Genes de susceptibilidad correspondientes a subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa
SP	Esporádico
Splicing	Eliminación de los intrones y unión de los exones en ARN durante el proceso de la transcripción
TMA	Micromatriz de tejido parafinado (<i>Tissue microarray</i>)
VHL	Enfermedad de von Hippel-Lindau

RESUMEN/ABSTRACT

Los feocromocitomas (PCCs) son tumores neuroendocrinos raros desarrollados a partir de la médula adrenal que suelen provocar hipertensión por la secreción excesiva de catecolaminas, mientras que los paragangliomas (PGLs) son PCCs localizados fuera de la glándula suprarrenal. Desde la identificación de los genes *SDH* como loci mayores de susceptibilidad para el desarrollo de PCC/PGL, varios grupos de investigación han encaminado sus esfuerzos a establecer el porcentaje de pacientes atribuible a mutaciones germinales en los genes hasta ahora conocidos, y a determinar los criterios clínicos para seleccionar adecuadamente los casos. En este trabajo, se ha llevado a cabo el estudio completo de 7 de estos genes (*RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDH5* y *TMEM127*) en 256 casos, aparentemente no relacionados, diagnosticados con PCC/PGL encontrándose una mutación germinal en un 39% de los pacientes. A esto hay que añadir un 1,2% de casos que, a pesar de presentar antecedentes familiares de la enfermedad, no tenían mutación en ninguno de los 7 genes de susceptibilidad, por lo que el “círculo genético” de esta enfermedad aún no está del todo cerrado. Las características clínicas con mayor asociación con la presencia de una mutación germinal fueron: presencia de antecedentes familiares y/o personales de la enfermedad, multiplicidad, bilateralidad, localización abdominal/torácica, malignidad y edad de aparición del tumor. El estudio detallado de estas características permite reconocer, en muchos casos, cual es el gen finalmente implicado en la enfermedad. En los casos “aparentemente esporádicos”, la subestratificación de acuerdo a la localización tumoral nos ha permitido el diseño de un algoritmo útil para el test genético. En este algoritmo, proponemos que los 45 años pueden ser el umbral por encima o por debajo del cual plantearse dicho test.

Por otra parte, mediante la caracterización molecular y el posterior análisis transcripcional de una serie de 84 PCCs/PGLs se pudo separar los tumores en dos grandes grupos de acuerdo a su perfil global de expresión: tumores *VHL/SDH* y tumores *RET/NF1*. Según nuestros datos, este perfil transcripcional se debe a una diferente desregulación pseudohipóxica dependiente de HIF, que a su vez permite distinguir entre las dos clases de PCCs/PGLs más relacionadas, *SDHB* y *VHL*. La sobre-expresión del ARNm de *Egln3*, observada únicamente en los PCCs con mutación en *VHL*, constituiría un marcador inequívoco de esta clase tumoral. Sin embargo, desconocemos el mecanismo de regulación post-transcripcional que explique la falta de concordancia entre los niveles de ARNm y los de proteína observados en nuestros tumores con mutación en *VHL*. En cuanto al estudio de posibles marcadores pronósticos, no fue posible obtener un predictor eficaz para PCCs/PGLs debido, seguramente, a la heterogeneidad genética de los tumores

malignos de nuestra serie y a la posibilidad de estar incluyendo como benignos casos que puedan metastatizar años después. Finalmente, la homogeneidad transcripcional de los tumores FPCC2 sugiere la existencia de un nuevo gen común de susceptibilidad. Se necesitarían más estudios que incluyan un mayor número de casos para detectar marcadores pronósticos útiles así como nuevos genes de susceptibilidad.

Pheochromocytomas (PCCs) are rare neuroendocrine tumors arisen from the adrenal medulla that usually cause hypertension because of the excessive catecholamine secretion, while paragangliomas (PGLs) are PCCs located out of the adrenal gland. Since the identification of the SDH genes as a major susceptibility *loci* for the development of PCC/PGL, several research groups have focussed their efforts to establish the percentage of patients carrying a germline mutation in one of the known susceptibility genes described so far, and to determine the clinical criteria to properly select the cases. In this work, it has been performed the complete study of seven of these genes (*RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDH5* y *TMEM127*) in 256 apparently unrelated cases diagnosed with PCC/PGL, and we have found a germline mutation in 39% of the patients. In addition, there are 1.2% of cases that, despite showing familial antecedents, they do not have mutations in any of the seven susceptibility genes, and thus the “genetic circle” of this disease is not closed yet. The clinical features with a highest association with the existence of a germline mutation were: presence of familial and/or personal antecedents of the disease, multiplicity, bilaterality, thoracic/abdominal location, malignancy and age of onset. The study of these features in depth allow us in the majority of cases to recognise which is the gene finally involved in the disease. In the “apparently sporadic” cases, the sub-stratification according to tumor location have led us to design a useful genetic testing algorithm. In this algorithm, we propose that 45 years of age could be the threshold above or below which consider the genetic test.

On the other hand, by means of the molecular characterization and subsequent transcriptional analysis of a series of 84 PCCs/PGLs, we were able to separate the tumors in two main groups according to their global expression profile: VHL/SDH and RET/NF1 tumors. According to our data, this transcriptional profile is caused by a different HIF-dependent pseudohypoxic deregulation, which also allowed us to distinguish between the two closest classes, SDHB and VHL. The overexpression of EglN3 mRNA, only observed in PCCs with mutations in *VHL*, is a unequivocal hallmark of this tumor class. Nevertheless, we do not know the post-transcriptional regulatory mechanism that explains the lack of correlation between mRNA and protein levels observed in our tumors with mutations in *VHL*. Regarding the study of prognostic markers, it was nor possible to obtain an efficient predictor for PCCs/PGLs, probably due to the genetic heterogeneity of the malignant tumors of our series, and to the possibility of include amongst the benign cases tumors that may metastasize years later. Finally, the transcriptional homogeneity of FPCC2 tumors suggests the involvement of a novel common susceptibility gene. It is necessary to perform more

studies, including a higher number of cases, in order to identify useful prognostic markers and new susceptibility genes.

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD

Los feocromocitomas (PCCs) son tumores neuroendocrinos que se desarrollan a partir del tejido cromafín de la médula suprarrenal, causando en muchos casos hipertensión arterial por una secreción excesiva de catecolaminas [1]. Cuando un PCC aparece en una localización extra-adrenal se suele denominar paraganglioma (PGL). Los PGLs pueden desarrollarse a partir de cualquier paraganglio del sistema nervioso simpático, y más raramente del parasimpático, siendo los que se localizan en la zona de la cabeza y el cuello fundamentalmente no secretores [3].

1.1. Historia

El primer caso de PCC descrito en la literatura fue diagnosticado en el año 1884 en Wittenweiver, población de la Selva Negra alemana cercana a Lahr. La paciente, una mujer de 18 años, fue ingresada en el hospital con un cuadro clínico de palpitaciones, ansiedad, vómitos, dolor de cabeza y debilidad muscular. Diez días después del ingreso falleció y la autopsia reveló dos tumores adrenales que fueron diagnosticados como sarcoma y angio-sarcoma adrenal respectivamente. La revisión del caso y su posterior publicación fue realizada por el Dr. Felix Fränkel en 1886, aunque entonces no se incluyó aún el término PCC. Este fue introducido en 1912 por Pick para designar a aquellos tumores cuyas células tenían afinidad por las sales de cromo, tal y como había demostrado 16 años antes Manasse [4]. El término PGL fue adoptado años antes, en 1908, por Alezais y Peyron para designar a los tumores cromafines extra-adrenales surgidos a partir de los paraganglios. Más de un siglo después, el caso fue revisado por Neumann y colaboradores [5] ante la sospecha de que se tratara de un caso hereditario, ya que la paciente había sido diagnosticada a una edad muy temprana y presentaba un tumor bilateral. Para ello, se confeccionó un árbol genealógico que incluía a 45 parientes y se llevó a cabo una búsqueda de todos los posibles familiares vivos de la probando. Hasta 6 familiares habían desarrollado PCC y en cuatro de ellos se había diagnosticado también carcinoma medular de tiroides (MTC). El estudio genético de cuatro de los familiares vivos afectados pudo determinar finalmente que el primer caso descrito en la literatura con un PCC era un caso de neoplasia endocrina múltiple de tipo 2 (MEN2) con mutación en el gen *RET*. Esta conclusión, en absoluto anecdótica, encaja perfectamente con lo que hoy en día se sabe sobre la genética de estos tumores.

1.2. Presentación clínica

Como ya se ha mencionado, la localización anatómica de estos tumores nos permite hacer una primera distinción en cuanto a su nomenclatura. Los PCCs constituyen aproximadamente un 85% del total y aparecen localizados en la médula suprarrenal. El 15% restante se localiza en paraganglios extra-adrenales del sistema nervioso autónomo:

- **Simpático:** PGLs abdominales/retroperitoneales (81%), PGLs torácicos (11%) y PGLs craneales (3%) [1].
- **Parasimpático:** PGLs de cabeza y cuello (5%)

Las principales localizaciones abdominales/retroperitoneales son: el órgano de Zuckerkandl, la vejiga urinaria, el hilio renal, la uretra y la glándula prostática (Figura 1A). Los PGLs torácicos se desarrollan mayoritariamente en la región media del tórax o en la base del corazón. Finalmente, los PGLs de cabeza y cuello se localizan sobre todo en el cuerpo carotídeo aunque pueden aparecer también en paraganglios yugulares, timpánicos, vagales, laríngeos o intratiroideos (Figura 1B) [1]. Finalmente, cabe mencionar que existe un porcentaje ínfimo de tumores, con características diferentes al resto de los PGLs, que se desarrolla en la región de la *cauda equina*.

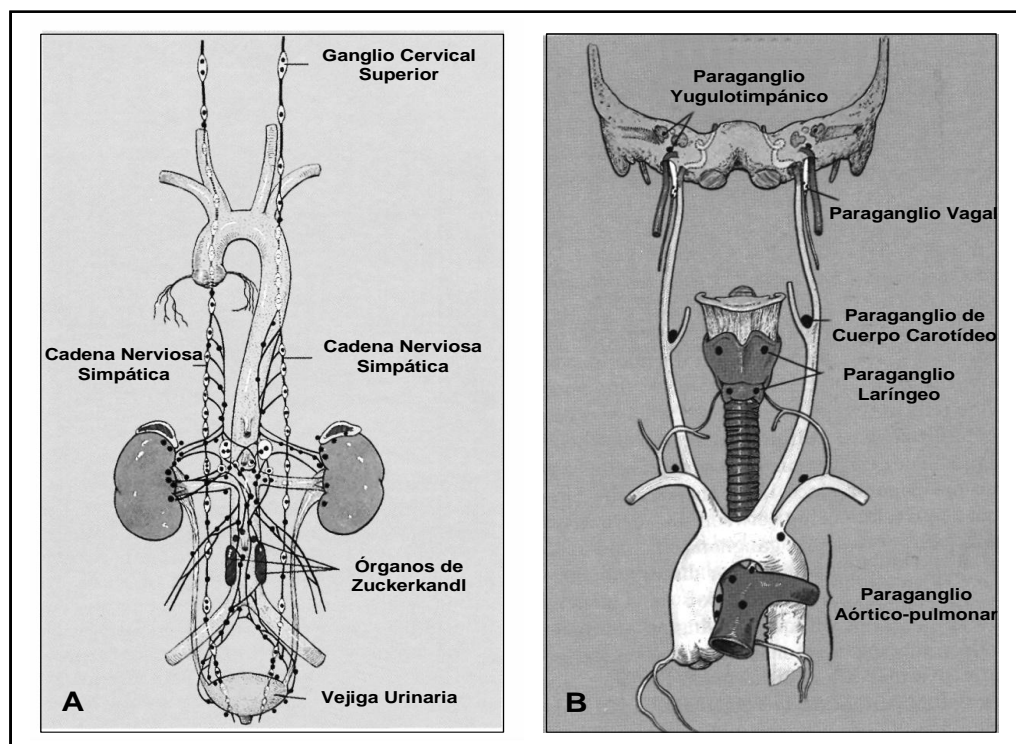


Figura 1. A) Distribución anatómica de los paraganglios simpatoadrenales. B) Distribución anatómica de los paraganglios de la cabeza y el cuello. Adaptado de Lack, 1997 [1]

Tanto los PCCs como los PGLs pueden presentarse bien de forma aislada o aparecer como tumores bilaterales o múltiples en distintas localizaciones anatómicas en un mismo paciente. Esta condición multifocal suele estar asociada a la presencia de una alteración germinal [6, 7].

Los síntomas clínicos asociados con la presencia de un PCC tienen que ver principalmente con la sobre-secreción de catecolaminas. Los más frecuentes son: hipertensión arterial, dolores de cabeza, palpitaciones, taquicardia, episodios de sudoración repentina, ansiedad, palidez, náuseas y vómitos, dolor abdominal, pérdida de peso, intolerancia al calor, hiperglicemia, y estreñimiento. Estos mismos síntomas se producen en el caso de pacientes con PGLs abdominales o torácicos, fundamentalmente secretores, aunque en estos casos también pueden producirse síntomas por el efecto de la masa tumoral (hidroureteronefrosis, hipertensión renovascular, etc). En el caso de los PGLs desarrollados en la región de la cabeza y el cuello, normalmente no secretores, los síntomas se producen casi siempre por la compresión que ejerce la masa tumoral y dependen de la localización anatómica y del tamaño del tumor. Estos síntomas incluyen: pérdida de audición unilateral, *tinnitus* pulsátil, ronquera, tos, dolor de cabeza, sensación de plenitud faríngea, dificultad para tragar y problemas con la movilidad de la lengua.

1.3. Epidemiología

Debido a que los PCCs y los PGLs son tumores extremadamente raros, no existen registros nacionales que permitan establecer cuál es la incidencia real de estas neoplasias. Sin embargo, existe un porcentaje de estos tumores (0,05%) detectado por azar durante las autopsias, que hace sospechar que la incidencia de la enfermedad pueda estar subestimada [8]. La incidencia anual de PCC en población española publicada en 1994 por Fernandez-Calvet y Garcia-Mayor es de 2,06 casos por millón [9], similar a la estimada en población sueca (2,1 casos por millón) [10], e inferior que la descrita para la población norteamericana (5-9,5 casos por millón) [11, 12]. Si atendemos a la prevalencia de PCC en pacientes con hipertensión, ésta se encuentra en torno a un 0,1-0,6% [8].

La edad de aparición de estos tumores es muy variable dependiendo de si nos encontramos ante un caso esporádico o hereditario, e incluso en estos últimos parece haber diferencias entre los distintos síndromes familiares asociados a la presencia de un PCC/PGL. En líneas generales, podría hablarse de un pico de incidencia entre los 30-40 años de edad [12]. Por otra parte, en grandes series de

pacientes se ha descrito una incidencia de la enfermedad superior en mujeres [13, 14], si bien estas diferencias no parecen significativas.

Además de la predisposición genética producto de la mutación de alguno de los genes de susceptibilidad, existen determinadas circunstancias o agentes que pueden aumentar el riesgo a desarrollar uno de estos tumores. Entre ellas cabe destacar la situación crónica de hipoxia, como la que se produce al vivir a una elevada altitud [15].

2. DIAGNÓSTICO

Ante la presencia de un PCC o un PGL, alrededor del 90% de los pacientes acudirá a la consulta médica aquejado de un cuadro de hipertensión arterial. El 10% restante será más difícil de reconocer inicialmente puesto que los síntomas por el efecto de la masa tumoral son mucho menos específicos. Para ambos casos, existe una serie de pruebas clínicas, detalladas a continuación, que ayudan a confirmar la sospecha diagnóstica de PCC/PGL.

2.1. Test bioquímico: detección de catecolaminas

Las catecolaminas son pequeñas moléculas con función hormonal sintetizadas principalmente en el sistema nervioso central, los nervios simpáticos y las células cromafines de la médula adrenal, aunque hay otras células no neuronales del tracto digestivo y de los riñones que también son capaces de producirlas en menor medida. [16]. Las principales catecolaminas endógenas producidas por el cuerpo humano son: norepinefrina, epinefrina y dopamina. Estos compuestos están formados por fenilalanina y tirosina, obteniéndose esta última a través de la dieta o siendo producida en el hígado, a partir de la fenilalanina, mediante la acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa. La tirosina es entonces transportada a los tejidos secretores de catecolaminas, en donde mediante una serie de reacciones se convierte en dopamina, norepinefrina y finalmente en epinefrina (Figura 2).

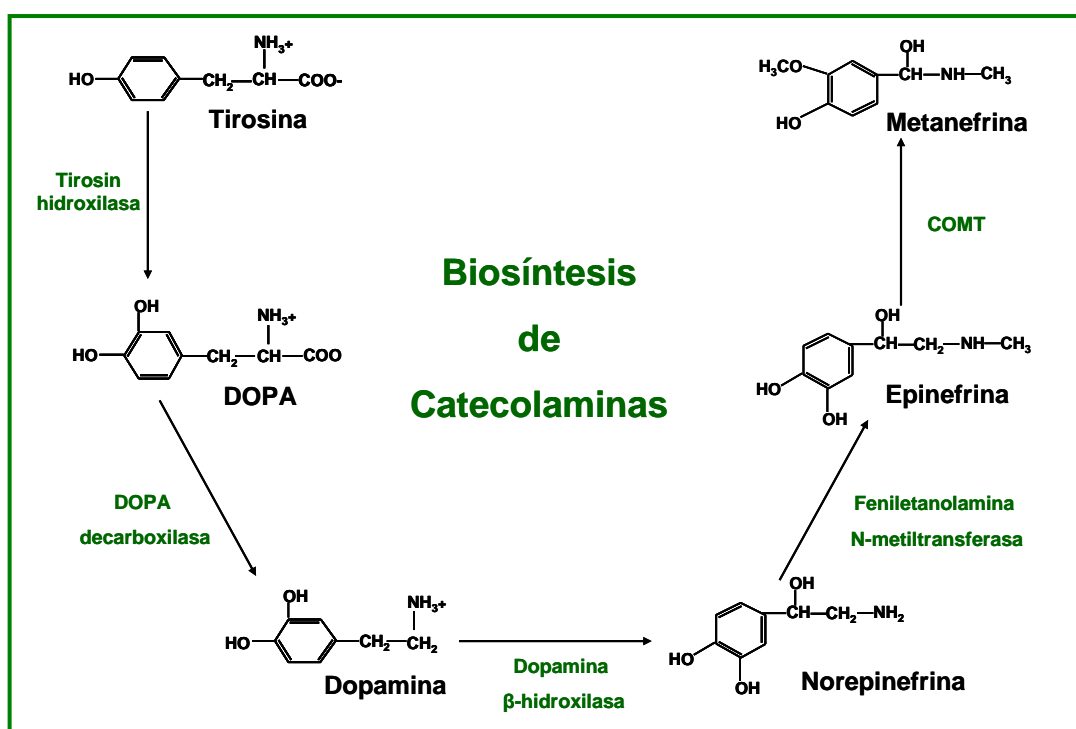


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de catecolaminas

Uno de los problemas asociados al diagnóstico bioquímico de estos pacientes, es que no ha habido consenso sobre qué método de detección debería aplicarse de forma rutinaria. Tradicionalmente se han venido realizando cuantificaciones de los niveles de catecolaminas en sangre o en orina, así como metanefrinas y ácido vanilmandélico en orina [8]. Sin embargo, las últimas recomendaciones indican que la cuantificación de metanefrinas libres en plasma mediante cromatografía líquida de alta resolución proporciona una mayor eficacia, con una sensibilidad del 98% y una especificidad del 92% [17]. Del mismo modo, se puede llevar a cabo la cuantificación en orina, mediante espectrofotometría, de las metanefrinas fraccionadas, esto es, la cuantificación de las normetanefrinas y las metanefrinas por separado. La recomendación de medir los niveles de metanefrinas se basa en el hecho de que los PCCs tienen una actividad enzimática, catecol-O-metiltransferasa (COMT), que metaboliza las catecolaminas a metanefrinas dentro de las células tumorales (Figura 2) [18]. Esta acumulación de metanefrinas en las células del tumor se produce de forma continua y no de forma episódica como ocurre con la secreción normal de catecolaminas. Este hecho proporciona una mayor eficacia en la detección de estos tumores. Según varios estudios, los pocos pacientes que con un PCC tienen un resultado negativo para las metanefrinas libres en plasma, presentan tumores muy pequeños (microscópicos) o bien no

producen norepinefrina o epinefrina [17]. Estos pacientes negativos para el test suelen ser normotensos y sin síntomas de una secreción excesiva de catecolaminas. Por último, la medida de metoxitiramina, originada a partir de dopamina por acción de la actividad enzimática COMT, se recomienda sólo en el caso de tumores secretores de dopamina.

2.2. Evaluación mediante imagen

La evaluación mediante técnicas de imagen no debería plantearse hasta no conocer los resultados del test bioquímico, salvo en el caso de existir otras evidencias que apunten claramente a la presencia de un PCC/PGL. Entre éstas se cuentan los antecedentes familiares o personales de la enfermedad, así como claros síntomas clínicos que apunten a la presencia de una masa tumoral. Podemos distinguir entre las técnicas de imagen anatómicas y las funcionales.

Estudios anatómicos

Las dos técnicas de imagen recomendadas para la localización inicial de un PCC/PGL son: la tomografía computarizada (CT) y la resonancia magnética (MRI). Ambas técnicas tienen sensibilidades cercanas al 90-100% y especificidades que oscilan entre el 70-80% en la detección de PCC/PGL [19]. La CT, con o sin contraste, podría ser la técnica recomendada en el caso de tumores abdominales (PCC y PGL abdominal), mientras que la MRI sería la técnica elegida en el caso de PGLs extra-adrenales en general o de tumores desarrollados en embarazadas, niños o personas alérgicas al contraste. Sin embargo, en muchos casos es la propia estandarización del procedimiento en el centro médico correspondiente la que decide la técnica a emplear [8].

Estudios funcionales

Existe un debate sobre la conveniencia de continuar con el diagnóstico, utilizando alguna de las técnicas de imagen funcional disponibles, cuando se tiene un resultado positivo por CT o MRI. En este sentido, el empleo de técnicas de imagen funcional para el diagnóstico de lesiones unilaterales reveladas inicialmente por CT o MRI, cuando no existe historia familiar o signos de malignidad, no parece estar recomendada [20]. La escintigrafía con metayodobencilguanidina (MIBG) está recomendada en el caso de sospecha de tumores múltiples, bilaterales o con lesiones metastásicas. Esta técnica suple la falta de especificidad de las técnicas anatómicas porque se basa en la adquisición

de un análogo estructural de la norepinefrina, que permite identificar específicamente (90-100%) los tumores derivados de la cresta neural. Ocasionalmente se está utilizando también en el tratamiento de PCC/PGL malignos, aunque presenta algunos problemas de toxicidad [21]. Por otro lado, entre las técnicas de imagen funcional basadas en la tomografía por emisión de positrones (PET), la que utiliza 2-Fluoro-D-desoxiglucosa (FDG) unida al ^{18}F es la que ha mostrado una mayor eficiencia, que no especificidad [8], en la detección de PGL metastásicos, especialmente en el caso de tumores asociados a mutaciones en *SDHB* [22]. Otro PET más específico para el diagnóstico de PCC es el que utiliza ^{18}F –fluorodopamina en lugar de análogos de glucosa. Finalmente, el empleo de análogos de somatostatina, como el octreotide, puede ser una alternativa si no se dispone de otra técnica funcional.

2.3. Valoración inmunohistoquímica

Como se ha mencionado con anterioridad, el término cromafín que se aplica a estos tumores hace referencia al color pardo que adquirirían los gránulos de secreción al ser tratados con sales de cromo, como resultado de la oxidación y polimerización de éstas [4]. Esta técnica diagnóstica, actualmente en desuso, ha sido sustituida por la tinción de las vesículas de secreción (cromogranina A y sinaptofisina), así como de las células sustentaculares (S-100). Por otra parte, se ha propuesto recientemente que la negatividad para la tinción inmunohistoquímica de la proteína SDHB constituye un método diagnóstico para los síndromes paraganglionares, aunque otros autores han descrito también tinción negativa en los tumores con mutaciones en el gen *VHL* [23, 24].

3. TRATAMIENTO

Una vez localizado y diagnosticado el tumor, la cirugía es el principal tratamiento de la enfermedad. Previo a la cirugía, y en el caso de los tumores secretores de catecolaminas, debe realizarse un tratamiento preoperatorio para evitar las crisis hipertensivas, arritmias, isquemias cardíacas y edemas pulmonares durante la intervención [25]. Este tratamiento consiste en la administración de agentes α - y β -bloqueantes adrenérgicos que permitan controlar la presión arterial y eviten el riesgo intraoperatorio. La cirugía laparoscópica es la más recomendada para tumores adrenales y extra-adrenales retroperitoneales, ya

que ha demostrado: bajas tasas de morbilidad postoperatoria, reducido tiempo de permanencia en el hospital y escaso gasto sanitario [26]. Hay que tener en cuenta que los casos extra-adrenales y/o familiares muestran un mayor riesgo de recurrencia. Por lo que se refiere a los pacientes con PGLs de cabeza y cuello, la accesibilidad del tumor condicionará el tipo de tratamiento. En el caso de no poder realizarse la resección tumoral, se llevará a cabo un seguimiento del mismo para evitar los daños provocados por el efecto de la masa tumoral. Finalmente, algunos casos inoperables son tratados con radioterapia.

Mención aparte merecen los casos malignos. Hasta la fecha, no existen marcadores morfológicos ni inmunohistoquímicos que permitan predecir el curso clínico de la enfermedad, siendo la presencia de metástasis el único criterio tenido en cuenta [27]. A pesar de los esfuerzos que se están realizando para encontrar predictores que ayuden en el seguimiento y tratamiento de los pacientes [8, 28], hasta el momento el único criterio pronóstico de malignidad útil es la presencia de alteraciones germinales en el gen *SDHB* [7]. En este sentido, en los pacientes positivos para mutaciones en *SDHB* se recomienda realizar una extirpación temprana del tumor con el fin de reducir el riesgo que tienen estos tumores de metastatizar (suponen hasta un 30% de los casos malignos) [29, 30]. Aparte de los ensayos clínicos con MIBG ya mencionados y algún estudio centrado en el uso de quimioterapia combinada [31], los tratamientos experimentales centrados en la regulación de moléculas implicadas en las rutas más frecuentemente alteradas en PCC/PGL (*HIF*, *VEGF*, *PDGF-β*, *RET*) parecen ser la única alternativa para los casos malignos [32, 33]. Recientemente se ha probado con relativo éxito el tratamiento con sunitinib, fármaco que tiene como diana a *VEGF*, *PDGF-β* y *RET* entre otras moléculas, observándose una reducción tanto de los síntomas como del volumen tumoral [34, 35].

4. GENÉTICA

Hasta el año 2000, se consideraba al PCC (incluyendo en el término tanto PCCs como PGLs) como “el tumor del 10%” ya que:

- un 10% de los casos eran bilaterales
- un 10% eran extra-adrenales
- un 10% eran familiares
- un 10% eran malignos

Los síndromes tumorales endocrinos asociados a la aparición de un PCC/PGL conocidos hasta entonces eran: neoplasia endocrina múltiple de tipo 2 (MEN2), enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL), neurofibromatosis de tipo 1 (NF1) y los síndromes paraganglionares (sin genes conocidos en aquel momento). Sin embargo, en los últimos años hemos asistido a un cambio sustancial de este escenario. En 2000, y después de varios estudios de ligamiento que asociaban el *locus* genético 11q23 al desarrollo de PGL [36-38], se identificó el gen *SDHD* (11q23), que codifica una de las subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), como un gen de susceptibilidad para el desarrollo de PGL [39]. Esta enzima, involucrada tanto en el ciclo de Krebs como en la cadena respiratoria, consta de otras tres subunidades, dos de las cuales (SDHB, en 1p36 y SDHC, en 1q21) fueron posteriormente descritas como alteradas en pacientes con PGL o PCC [40, 41].

Recientemente, se ha sugerido que las alteraciones en todos estos genes de susceptibilidad afectarían a una misma ruta apoptótica neuronal [32]. Además, durante el último año se han descrito mutaciones en tres nuevos genes cuya implicación en la enfermedad está aún por determinar, estando uno de ellos (*SDH5*, 11q13.1) también involucrado en el ciclo de Krebs [42].

Desde la identificación de los genes *SDH* como *loci* mayores de susceptibilidad para el desarrollo de PCC/PGL, varios grupos de investigación han encaminado sus esfuerzos a establecer el porcentaje de pacientes atribuible a mutaciones germinales en los genes hasta ahora conocidos: *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD* y *NF1* [6, 7, 43, 44]. Según estos trabajos, este porcentaje podría estar en torno al 25-30%. Sin embargo, no todos estos estudios incluyen el análisis de grandes delecciones de los genes *SDH*, de modo que el porcentaje de casos hereditarios podría ser aún mayor [45]. A todo esto hay que añadir que todavía existe un número, aún por determinar, de casos familiares sin mutación en ninguno de los genes de susceptibilidad identificados hasta la fecha [46].

4.1. Neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN2)

MEN2 es un síndrome tumoral autosómico dominante causado por mutaciones activadoras del proto-oncogen *RET*, localizado en la región cromosómica 10q11.2, que codifica un receptor tirosín-quinasa transmembrana. Las mutaciones que afectan fundamentalmente a una región rica en cisteínas, clave para la unión del ligando, y a residuos específicos de la región intra-citoplasmática provocan que la proteína RET se active constitutivamente, alterándose la regulación de la

proliferación celular y la apoptosis [12]. La incidencia de la enfermedad es de 1/25000-1/40000 [47] nacimientos y existen tres subtipos clínicos atendiendo al fenotipo:

- **MEN 2A** (OMIM: #171400): es el más frecuente (80% de los casos) y se caracteriza por la aparición de MTC, PCC e hiperparatiroidismo (HPT) primario (que suele afectar a más de una glándula paratiroidea) principalmente, si bien en un 5% de los pacientes también aparece amiloidosis liquénica cutánea, que se caracteriza por la deposición de proteína amiloide en dermis y epidermis (Tabla 1).

- **MEN 2B** (OMIM: #162300): supone el 5% de los casos y las principales manifestaciones clínicas son MTC, PCC, neuromas múltiples en párpados, lengua y labios, así como hábito marfanoide. En los pacientes MEN 2B, la enfermedad comienza a una edad más temprana (hasta 10 años antes que en MEN 2A) y presenta un curso clínico más agresivo [48].

- **FMTc** (OMIM: #155240): se caracteriza por el desarrollo de MTC como único signo clínico de la enfermedad. Los criterios para considerar que una familia presenta FMTc son: la existencia de al menos 10 casos de CMT y la ausencia de otros signos clínicos tras aplicar métodos diagnósticos adecuados [49].

La penetrancia de las mutaciones en *RET* es de un 95%, si tenemos en cuenta las mutaciones asociadas a una mayor capacidad transformante [50], y aproximadamente un 50% de los pacientes con mutación desarrolla un PCC. La mayor parte de los PCCs aparecen asociados a mutaciones de los codones 634 ó 618 (MEN 2A) y 918 (MEN 2B), y suelen ser benignos, adrenales, bilaterales y secretores de epinefrina.

SÍNDROME	GEN ASOCIADO	HERENCIA	LOCUS	CLÍNICA ASOCIADA
MEN2	<i>RET</i>	Autosómica dominante	10q11.2	MTC, HPT 1º
VHL	<i>VHL</i>	Autosómica dominante	3p25-26	Hbl (CNS y retina), CRCC, tumores pancreáticos, tumores del saco endolinfático del oído interno
PGL1	<i>SDHD</i>	Autosómica dominante con <i>Imprinting</i> materno	11q23	PGL de cabeza y cuello, abdominal/torácico, PCC. Raramente GIST
PGL3	<i>SDHC</i>	Autosómica dominante	1q21	Raramente GIST
PGL4	<i>SDHB</i>	Autosómica dominante	1p35-36.1	Raramente CRCC, GIST o CPT
NF1	<i>NF1</i>	Autosómica dominante	17q11.2	Neurofibromas, manchas café con leche, pecas axilares, gliomas ópticos, hamartomas pigmentados del iris

Tabla 1. Características genéticas y clínicas asociadas con los 6 síndromes relacionados con PCCs (Adaptado de Neumann y Eng, 2009 [2]).

4.2. Enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL)

VHL (OMIM: #193300) es un síndrome tumoral autosómico dominante originado por mutaciones germinales en *VHL*, un gen supresor tumoral localizado en la región cromosómica 3p25-26. El gen *VHL* codifica dos isoformas proteicas distintas que han sido asociadas con numerosos procesos celulares: proteólisis, inhibición de la apoptosis, control del ciclo celular y ensamblaje de la matriz de fibronectina [51]. La función más conocida de la proteína VHL (pVHL) es la ubiquitinación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) para su posterior degradación en el proteosoma. La pérdida de función de pVHL por una mutación germinal en *VHL*, desencadena la sobre-expresión de genes inducibles por hipoxia (ej. *VEGF*), lo cual conduce a un proceso de angiogénesis.

La incidencia de VHL es de 1/36000 nacimientos [52] y las principales características clínicas de esta enfermedad son: angiomas retinianos, hemangioblastomas del sistema nervioso central (SNC), carcinoma renal de células claras (CRCC), tumores pancreáticos, tumores del saco endolinfático y del ligamiento ancho, quistes renales y pancreáticos y PCCs/PGLs (Tabla 1). Existe una clasificación clínica ampliamente aceptada, basada en la presencia o ausencia de PCC:

- **VHL tipo 1:** definido por la ausencia de PCC, y con CRCC y hemangioblastomas retinianos y cerebelosos como principales manifestaciones clínicas. El 90% de los pacientes con VHL tipo 1 son portadores de mutaciones germinales que truncan la proteína o de mutaciones de cambio de aminoácido. Según varios estudios estructurales, los cambios de aminoácido asociados a este subtipo conducen a un plegamiento incorrecto de pVHL o a una incapacidad para unirse a otras proteínas del complejo de ubiquitinación [51, 53, 54].

- **VHL tipo 2:** incluye pacientes que desarrollan PCC y a su vez se puede dividir en tres subtipos diferentes:

- **tipo 2A:** incluye pacientes que desarrollan PCC, hemangioblastomas y tienen un bajo riesgo de desarrollar CRCC.

- **tipo 2B:** pacientes que desarrollan un cuadro clínico completo: PCCs, hemangioblastomas de retina y SNC, y CRCC.

- **tipo 2C:** pertenecen a este subtipo los pacientes en los que la única manifestación de la enfermedad es el PCC.

Las mutaciones de *VHL* relacionadas con los subtipos 2A y 2B se han asociado con una desregulación completa o parcial de HIF-1 α , mientras que las mutaciones en el subtipo 2C parecen no afectar a la degradación de HIF-1 α mediada por pVHL [55]. Aunque el PCC es a menudo la manifestación clínica más frecuente en los pacientes 2A y 2B, y la única en los 2C, la prevalencia global de PCC en VHL está entre el 10 y el 15% [48]. Aproximadamente un 50% de los PCCs aparecidos en VHL son bilaterales y suelen producir únicamente norepinefrina [56], mientras que el porcentaje de casos malignos o extra-adrenales es inferior al 5% [57].

4.3. Síndromes Paraganglionares

La SDH cataliza la conversión de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, siendo la única enzima del ciclo involucrada al mismo tiempo en la cadena respiratoria. Esta enzima constituye el complejo II de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y está compuesta por cuatro subunidades: SDHA, SDHB, SDHC y SDHD. Las dos primeras son subunidades catalíticas y las dos últimas son subunidades de anclaje a la membrana interna mitocondrial. En 2000 se describió por primera vez la existencia de alteraciones germinales en *SDHD* en pacientes con PGL hereditario, dando por fin una explicación al primero de los síndromes paraganglionares [39]. Posteriormente se encontraron mutaciones en los genes *SDHB* y *SDHC* tanto en pacientes con PGL como con PCC [40, 41, 58, 59]. Sin embargo, las mutaciones germinales en el cuarto gen del complejo II, *SDHA*, se asocian con un síndrome neurodegenerativo conocido como síndrome de Leigh (OMIM: #256000). La ausencia de PGL o PCC en estos pacientes parece ser debido a la presencia de dos isoformas de la proteína SDHA en el tejido paraganglionar, lo cual compensaría el efecto de una mutación germinal del gen en este tejido [60]. Del mismo modo, las mutaciones en *FH*, que codifica otra enzima del ciclo de Krebs, tampoco predisponen al desarrollo de PGL sino a otro tipo de cáncer hereditario: leiomiomatosis hereditaria y cáncer renal [61]. Recientemente, se ha descrito una mutación en un cuarto gen (*SDH5*) también involucrado en el ciclo de Krebs en una familia con PGL hereditario [42]. Por último, cabe destacar que se han encontrado pacientes con síndrome de Carney-Stratakis portadores de mutaciones en los genes *SDH*, e incluso se han llegado a asociar mutaciones en *SDHB* y *SDHD* con el síndrome de Cowden “like”, [62, 63], siendo esto último un hallazgo que ha generado una gran controversia.

Se ha demostrado que las mutaciones en los genes *SDH* producen una pérdida de la actividad enzimática que lleva a la activación de la ruta angiogénica de hipoxia mediada por HIF-1 α y VEGF [64, 65]. La inhibición de la SDH provoca una acumulación de succinato que a su vez inhibe la actividad prolil hidroxilasa necesaria para la degradación de HIF-1 α [32]. Esta conexión entre las mutaciones en los genes *SDH* y la ruta de HIF-1 α (y por tanto de pVHL) se ha visto también mediante estudios de perfiles de expresión tumoral [23]. Sin embargo, todavía se desconocen los mecanismos precisos que desencadenan la tumorigenesis en estos pacientes.

4.3.1. PGL1

El síndrome paraganglionar PGL1 (OMIM: #168000) se caracteriza por la presencia de mutaciones en el gen *SDHD*, localizado en el cromosoma 11q23 [66]. La principal manifestación clínica es la presencia de PGLs de cabeza y cuello, fundamentalmente de localización carotídea, aunque también pueden aparecer PCCs y PGLs simpáticos secretores de norepinefrina. El espectro de mutaciones del gen es muy variable y engloba todo tipo de mutaciones puntuales y grandes deleciones [67]. La naturaleza de los tumores asociados a mutaciones en *SDHD* suele ser benigna y existe cierta asociación con la presencia de tumores en múltiples localizaciones [44].

La transmisión de la enfermedad en el PGL1 está sujeta a un fenómeno de *imprinting* materno en el que únicamente se produce la enfermedad cuando es heredada por vía paterna (Tabla 1). Esta situación puede ocasionar saltos generacionales en la manifestación de la enfermedad, por lo que en muchos casos resulta difícil reconocer la existencia de un síndrome hereditario. Recientemente se ha descrito el caso de un paciente con PGL asociado a mutación en *SDHD* en el que la transmisión aparentemente se había producido por vía materna [68], aunque dado que es el único caso descrito hasta la fecha, y que no hubo confirmación anatomopatológica del tumor, se trata de una interpretación no aceptada [69].

4.3.2. PGL2

SDH5, recientemente identificado [42] y que codifica también una enzima que participa en el ciclo de Krebs, es el gen correspondiente al locus PGL2 (11q13.1;

OMIM: #601650). Este *locus* fue descrito por primera vez en 1981 en una familia holandesa con 23 miembros afectados únicamente con PGLs de cabeza y cuello, normalmente múltiples, y con una herencia que sugería un fenómeno de *imprinting* materno [70]. Finalmente, en 2009 y gracias a un estudio realizado en levaduras, se ha podido asociar la presencia de una mutación inactivante en *SDH5* con la enfermedad. La proteína SDH5 interviene directamente en la flavinación de SDHA, y su pérdida de función inhibe la actividad de la enzima SDH [42]. Las mutaciones en este gen abren de nuevo el debate sobre si deben buscarse mutaciones germinales en *SDHA*, aunque otros estudios descarten categóricamente esta posibilidad [71].

4.3.3. PGL3

El PGL3 (OMIM: #605373) se asocia con mutaciones en *SDHC*, gen que codifica la segunda subunidad de anclaje de la SDH, y que se localiza en el *locus* cromosómico 1q21 [40]. Este síndrome sigue un modo de herencia autosómico dominante (Tabla 1). Aunque se han descrito algunos casos con PGLs en otras localizaciones [59, 67, 72], la principal manifestación clínica son los PGLs de cabeza y cuello benignos [73]. Hasta la fecha se han publicado muy pocas mutaciones en el gen por lo que su inclusión en las recomendaciones de *screening* genético sigue siendo objeto de amplio debate [74-77].

4.3.4. PGL4

El último síndrome paraganglionar, PGL4 (OMIM: #115310), se debe a la presencia de mutaciones en el gen *SDHB* situado en el cromosoma 1p35-36.1 [41]. Los pacientes con mutaciones en este gen suelen desarrollar PGLs abdominales y torácicos secretores de norepinefrina y ocasionalmente de dopamina, aunque también tienen riesgo de PCC y PGLs de cabeza y cuello [6]. Otras manifestaciones extraparaganglionares aceptadas con el CRCC y el CPT, si bien se producen en una proporción muy baja de pacientes (Tabla 1) [78, 79]. A pesar de que se han descrito todo tipo de mutaciones en los pacientes SDHB, es particularmente llamativo el número de grandes deleciones que afectan a este gen [67, 80]. Otra particularidad asociada a las mutaciones en el gen *SDHB* es la escasa penetrancia que presentan, por lo que en muchos casos los pacientes no refieren antecedentes familiares de la enfermedad (Schiavi y col. en preparación). Por último, cabe destacar que la presencia de mutaciones en *SDHB* se ha

relacionado con un gran riesgo de metástasis, siendo éste un criterio ampliamente aceptado como factor pronóstico en el manejo clínico de estos pacientes. En este sentido, entre el 14 y el 28% de los pacientes con mutaciones en *SDHB* presentan metástasis [79, 81, 82], y entre un 20-29% de los casos malignos se explican por mutaciones en el gen *SDHB* [7, 81].

4.4. PCC familiar

En 2005, Dahia y col. identificaron dos nuevos *loci*, localizados en 2cen y 16p13, asociados a una susceptibilidad genética a desarrollar PCC. El gen localizado en el primero de ellos, *TMEM127*, ha sido recientemente identificado y codifica una proteína transmembrana de función aún desconocida que podría tener alguna implicación en la ruta de mTOR (comunicación personal de la Dra. Patricia Dahia). Los pacientes portadores de mutaciones en *TMEM127* (7 hasta la fecha) desarrollan únicamente tumores adrenales (PCCs), bilaterales en un 50% de los casos y secretores de epinefrina o norepinefrina indistintamente.

Otro gen localizado en 1p36, región frecuentemente perdida en tumores derivados de la cresta neural, se ha asociado con el desarrollo de PCC en una familia con predisposición a desarrollar tumores tanto neuronales como no neuronales [83]. El gen, *KIF1Bβ*, codifica una proteína quinasa implicada en la ruta neuronal de desarrollo de PCC y se ha descrito también como mutado en otro PCC aparentemente esporádico [84].

4.5. Otros síndromes asociados con PCC o PGL

4.5.1. Neurofibromatosis tipo 1 (NF1)

NF1 (OMIM: +162200) es una enfermedad autosómica dominante debida a mutaciones inactivantes del gen *NF1*, localizado en 17q11.2, cuyas principales características clínicas son: neurofibromas cutáneos, manchas café con leche, hamartomas en el iris, pecas axilares e inguinales y PCC. La proteína codificada por *NF1* se denomina neurofibrina y es una proteína activadora de GTPasa involucrada en la inhibición de la actividad del oncogen *Ras*, el cual controla el crecimiento celular y la diferenciación [12].

La incidencia de NF1 es de 1/3000 nacimientos [85] y la presencia de PCC en pacientes con la enfermedad es de aproximadamente un 2%, siendo la mayoría de ellos unilaterales (84%), benignos y secretores de norepinefrina [52].

4.5.2. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1 (MEN1)

Esta neoplasia constituye un síndrome autosómico dominante (OMIM: +131100) causado por mutaciones germinales inactivantes del gen *MEN1*, localizado en 11q13. La proteína menina interactúa con al menos 21 moléculas, implicadas en regulación transcripcional, estabilidad genómica, reparación del ADN, división celular y proliferación. Los pacientes con mutación en *MEN1* presentan principalmente: HPT primario, tumores enteropancreáticos y adenomas hipofisarios. Además estos pacientes pueden presentar manifestaciones cutáneas como angiofibromas o colagenomas, y otras manifestaciones neoplásicas como tumores tiroideos derivados de célula folicular, tumores adrenocorticales, o PCC. Sólo un escaso número de pacientes (~1%) desarrollan PCC [86], y en estos casos los tumores suelen ser unilaterales, benignos y productores de norepinefrina [87].

4.5.3. Síndrome de Carney-Stratakis

Se han descrito recientemente mutaciones en los genes de la SDH (*SDHB*, *SDHC* y *SDHD*) en pacientes con la diada de Carney-Stratakis (OMIM: #606864): PGL y tumores de estroma gastrointestinal (GIST) [88]. Sorprendentemente, ningún paciente con la triada de Carney (PGL, GIST y condroma pulmonar) presentó mutaciones en estos genes [89]. Esta enfermedad, se transmite de un modo autosómico dominante con penetrancia incompleta y los PGLs asociados con el síndrome suelen ser multifocales. Las mutaciones encontradas en estos pacientes no difieren de las asociadas con los síndromes paraganglionares, lo cual complica aún más el consejo genético en el caso de los portadores de mutaciones en los genes *SDH*.

4.6. PCC esporádico

Todos los genes implicados en la susceptibilidad hereditaria a desarrollar PCC/PGL son también buenos candidatos para explicar el desarrollo esporádico de estos tumores. Sin embargo, aunque se han descrito numerosos reordenamientos genómicos en las regiones cromosómicas en las que se localizan

estos genes [90, 91], la presencia de mutaciones somáticas es muy poco frecuente [92-95]. Una posible explicación podría ser que para que un PCC/PGL se desarrolle, las alteraciones en los genes de susceptibilidad deben producirse en estadios tempranos del desarrollo embrionario [32]. De esta forma, las mutaciones germinales permitirían a los progenitores neuronales escapar de la apoptosis del desarrollo y alcanzar el estadio necesario para la transformación neoplásica. Sin embargo, los mecanismos que llevan al desarrollo de los tumores esporádicos siguen sin estar del todo claros, y se requieren más estudios que permitan identificarlos. Por otra parte, el hecho de que un paciente presente un PCC o un PGL sin antecedentes familiares de la enfermedad (“aparentemente esporádico”), no asegura la ausencia de mutaciones germinales en alguno de los genes de susceptibilidad. Son numerosos los estudios que demuestran que una considerable proporción de estos casos son finalmente hereditarios debido a la presencia de mutaciones en *VHL* o en los genes *SDH* [7, 14].

4.7. Diagnóstico y consejo genético

En algunos casos, la presencia de algún rasgo clínico relacionado con los síndromes descritos con anterioridad permite dirigir el análisis genético de forma inequívoca hacia el gen candidato. Este es el caso de pacientes con PCC/PGL que refieren antecedentes personales o familiares de: hemangioblastomas (*VHL*), MTC (*RET*), manchas café con leche (*NF1*), etc. Por otra parte, otras características clínicas como la presencia de metástasis o la presencia de bilateralidad/multiplicidad, se han asociado más frecuentemente con síndromes concretos [6, 7]. Sin embargo, el problema surge en el caso de aquellos pacientes que presentan tumores benignos aislados sin antecedentes o bien aquellos que presentan antecedentes, pero sólo de PCC/PGL. Por todo ello, y debido a la enorme complejidad genética asociada a estos tumores, se necesitan guías o recomendaciones que ayuden a la racionalización del test genético. En cuanto al consejo genético ofrecido tanto a pacientes como a sus familiares, éste va a depender en gran medida del gen alterado. De este modo, cuando se trate de *SDHD* y *SDH5* habría que tener en cuenta el *imprinting*, mientras que cuando nos refiramos a *SDHB* habrá que considerar la baja penetrancia de las mutaciones observada para este gen.

5. GENÓMICA

Son muy pocos los trabajos publicados hasta la fecha centrados en el estudio de estos tumores desde un punto de vista genómico. En 2005, Dahia y col. llevaron a cabo un estudio transcriptómico de PCC/PGLs en el que estaban representadas todas las clases genéticas conocidas hasta entonces [23]. En este trabajo se pudo demostrar que los tumores *VHL* y los *SDH* presentaban un perfil transcripcional común, con una “firma” reconocible de hipoxia y oxido-reducción [23]. Recientemente, se ha confirmado dicho perfil de expresión en otro estudio centrado fundamentalmente en los genes implicados en el Efecto Warburg [96]. Sin embargo, nada se sabe acerca de las diferencias entre estas dos clases genéticas las cuales presentan un comportamiento clínico tan distinto. También en 2005, se identificaron dos *loci* de susceptibilidad a desarrollar PGL utilizando técnicas genómicas integrativas [97]. El gen localizado en uno de estos *locus*, *TMEM127*, ha sido recientemente identificado (comunicación personal de la Dra. Patricia Dahia), quedando aún pendiente la identificación del segundo de ellos. Se ha visto que los tumores asociados con este segundo *locus* presentan un perfil transcripcional muy similar al de los tumores con mutaciones en *RET*, por lo que el gen implicado podría estar relacionado con esta ruta oncogénica [23]. Por otra parte, otros estudios genómicos se han centrado en la búsqueda de perfiles transcripcionales asociados con mal pronóstico [98, 99], aunque hasta la fecha no se han descrito marcadores útiles como predictores de malignidad.

En definitiva, y a pesar de los esfuerzos encaminados a identificar las características clínicas asociadas con cada uno de los síndromes relacionados con el desarrollo de PCC/PGL, se necesitan más estudios centrados en series grandes de pacientes. Estos estudios deberían definir aún mejor los rasgos clínicos asociados a las mutaciones en cada uno de los genes y permitir, incluso, establecer diferencias inter-poblaciones. A esto habría que añadir que todavía existe un porcentaje de pacientes, que reúnen características clínicas asociadas a un cáncer hereditario y que no presentan mutaciones en los genes de susceptibilidad descritos hasta la fecha. Se hace necesario, por tanto, llevar a cabo nuevas aproximaciones que utilicen herramientas tanto genéticas como genómicas encaminadas a la identificación de dichos genes. Por otra parte, los estudios genómicos centrados en la caracterización de tumores pertenecientes a las diferentes clases genéticas permitirán un mayor conocimiento de las rutas metabólicas alteradas en cada caso. Así mismo pueden constituir una herramienta

idónea para identificar marcadores diagnósticos de uso clínico, tanto específicos de cada clase genética como predictores de su pronóstico.

OBJETIVOS

1. La caracterización molecular de los genes de susceptibilidad a desarrollar PCC y/o PGL en una serie de pacientes españoles con el objetivo de:
 - 1.1 Determinar la implicación de cada uno de los genes en la enfermedad en la población española.
 - 1.2 Precisar los criterios clínicos asociados a la presencia de mutaciones germinales en cada uno de estos genes.
 - 1.3 Establecer las guías de estudio genético de estos pacientes, con especial atención a los casos aparentemente esporádicos.
 - 1.4 Seleccionar casos familiares negativos para mutaciones en genes conocidos, como candidatos para la búsqueda de nuevos genes de susceptibilidad, y definir sus características clínicas.
 - 1.5 Mejorar el consejo genético facilitado tanto a los pacientes como a los portadores de mutaciones en los genes de susceptibilidad a PCC/PGL.
2. La determinación de los perfiles de expresión génica en una serie de PCCs y PGLs, con el objetivo concreto de:
 - 2.1. Determinar los perfiles de expresión asociados a las distintas características del tumor: clase genética, localización y curso clínico.
 - 2.2. Identificar las rutas diferencialmente alteradas entre las clases genéticas más relacionadas.
 - 2.3. Trasladar el conocimiento genómico a la identificación de marcadores de uso clínico asociados a las distintas clases genéticas.
 - 2.4. Establecer perfiles de expresión característicos de los casos familiares sin mutación e identificar rutas o genes alterados en estos tumores.
 - 2.5. Obtener predictores de mal pronóstico que identifiquen los casos con riesgo de metastatizar.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

1.1. Pacientes

Para la caracterización genética de los pacientes, se dispuso de una serie de 256 probandos, aparentemente no relacionados, diagnosticados con PCC/PGL. Las muestras de sangre periférica o ADN extraído fueron recopiladas a lo largo de 14 años, desde 1995 hasta 2008, procedentes tanto de hospitales públicos del Sistema Nacional de Salud como de centros privados del territorio nacional. De todos los pacientes, se obtuvo el correspondiente consentimiento informado para el estudio genético de los genes de susceptibilidad relacionados con su enfermedad. En algunos casos se pudo obtener muestra tumoral, congelada o en parafina, para su utilización en la caracterización de los perfiles de expresión. Los datos clínicos tenidos en cuenta para el posterior análisis fueron: edad al diagnóstico, localización del tumor, número de tumores, presencia de metástasis (en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento) y la existencia de antecedentes personales o familiares de la enfermedad o de enfermedades relacionadas. Para el análisis estadístico de los datos clínicos se utilizó el programa informático *R* v.2.7.2 (<http://www.r-project.org/>). Se llevó a cabo el test de Fisher cuando se emplearon muestras pequeñas y el análisis de varianza en las comparaciones de más de dos variables.

1.2. Tejidos congelados

El estudio de los perfiles de expresión se llevó a cabo sobre muestras de tejido tumoral congelado procedente de 84 pacientes con PCC o PGL (con o sin antecedentes familiares) y correspondientes, excepto un caso, a familias no relacionadas. Aunque algunos casos pertenecían a pacientes incluidos en el estudio de caracterización genética, en general los tumores empleados en el análisis de expresión constituían una serie independiente de tejidos. Un total de 55 muestras fueron obtenidas a lo largo de los últimos 9 años, gracias a la colaboración de la Red de Bancos de Tumores gestionado desde el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Se contó también con la colaboración del Instituto Veneto de Oncología (Padova, Italia) que proporcionó 28 muestras tumorales procedentes de pacientes de origen transalpino. Finalmente se hibridó un tumor procedente de un paciente de origen brasileño. Cinco tejidos adrenales normales y 1 tejido medular, también normal, fueron empleados como

controles del estudio. Para cada uno de los casos incluidos en el presente trabajo se obtuvo el correspondiente consentimiento informado así como la información anatomopatológica correspondiente.

Cada muestra de tejido congelado fue incluida en una matriz de polivinilo (Tissue-Tek® O.C.T.TM, Sakura, NL) y conservada a -80°C hasta el momento de su utilización. Para cada uno de los tejidos se llevó a cabo una tinción con hematoxilina-eosina (H&E) con el fin de evaluar la presencia y abundancia de células tumorales. Todas las muestras empleadas en el estudio de expresión presentaban un porcentaje superior al 80% de contenido celular tumoral, habiéndose desechado aquellas que no cumplían con este requisito.

El protocolo de tinción con H&E de las secciones de tejido congelado se detalla a continuación:

- 1.- Hidratar con etanol absoluto (2 minutos) y posteriormente con etanol al 95% (2 minutos).
- 2.- Lavar durante 2 minutos con agua destilada (B. Braun Medical SA, Barcelona, España).
- 3.- Teñir con hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
- 4.- Lavar durante 2 minutos con agua destilada.
- 5.- Teñir con eosina durante 2 minutos.
- 6.- Eliminar los restos de eosina utilizando etanol al 70%.
- 7.- Deshidratar mediante lavados sucesivos con etanol al 96% (30 segundos), etanol absoluto (2 minutos) y xilol (2 lavados de 2 minutos cada uno).
- 8.- Montar un cubreobjetos sobre la preparación con *Eukitt* (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EEUU).

Nota: La tinción de las secciones de tejido congelado no requiere ningún paso previo, ya que el O.C.T.TM no interfiere ni en la tinción de los cortes ni en la extracción de los ácidos nucleicos (ARN y ADN).

1.3. Tejidos embebidos en parafina

La validación de los resultados del estudio de expresión se llevó a cabo en una serie alternativa de tumores embebidos en parafina. Se dispuso de un total de 53 PCCs/PGLs, evaluados mediante tinción con H&E (con un paso previo de desparafinación con xilol), y a partir de los cuales se confeccionaron 2 *tissue microarrays* (TMAs). Para ello se seleccionaron áreas representativas de las diferentes lesiones, con el fin de obtener cilindros de 1 mm de diámetro, que

fueron posteriormente incluidos en un nuevo bloque de parafina con una separación de 0,8 mm entre cada muestra de tejido. Los tumores incluidos en los TMAs presentaban distintas mutaciones en los genes de susceptibilidad: 8 en *VHL*, 9 en *SDHB*, 24 en *RET* y 4 en *SDHD*. Además se incluyeron 8 casos esporádicos y 3 secciones de tejido adrenal normal como control. En cada TMA las muestras tumorales se encontraban por duplicado.

2. EXTRACCIÓN DE ADN

2.1. A partir de sangre periférica

Dado que las muestras de sangre empleadas en el presente estudio fueron recogidas a lo largo de 14 años, los métodos utilizados para su extracción han ido variando a lo largo del tiempo. En general, se realizaron extracciones siguiendo un método manual [100] (de 1995 a 2004) y un método automatizado desde 2004 (*MagNa Pure LC*; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Método manual (salino)

- 1.- Transferir la sangre a un tubo de fondo cónico de 50 ml.
- 2.- Añadir suero fisiológico hasta un volumen total de 50 ml y agitar con fuerza para homogeneizar.
- 3.- Centrifugar a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- 4.- Decantar el sobrenadante para obtener el *pellet* de leucocitos.
- 5.- Resuspender este *pellet* añadiendo agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 50 ml y agitar hasta que se desprenda el botón de células del fondo del tubo.
- 6.- Centrifugar a 3.000 rpm y a 4°C durante 15 minutos.
- 7.- Decantar para obtener el *pellet* de leucocitos.
- 8.- Añadir agua bidestilada estéril hasta un volumen final de 25 ml y agitar enérgicamente.
- 9.- Centrifugar a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- 10.- Decantar para obtener el *pellet* de leucocitos.
- 11.- Añadir, en función del tamaño del botón de células, de 4 a 7 ml de tampón de lisis de leucocitos (40 ml de NaCl 5 M, 4 ml de EDTA 0,25 M, 2,5 ml de Tris 2 M [pH 7,5] y agua destilada), de 266 a 466 µl de sodio dodecil sulfato (SDS) 25X y de 666 a 1.166 µl de solución de *proteínasa K* (10 mg/ml).

- 12.- Agitar hasta disgregar el botón de células e incubar durante toda la noche a 37°C.
- 13.- Para precipitar el ADN, añadir de 1,33 a 2,33 ml de NaCl, en función de los volúmenes empleados para la lisis de leucocitos.
- 14.- Agitar vigorosamente y centrifugar a 3.000 rpm a 4°C durante 30 minutos.
- 15.- Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 16.- Añadir dos volúmenes de alcohol etílico absoluto con respecto a la cantidad de tampón de lisis de leucocitos utilizada y agitar suavemente hasta que “la medusa” de ADN sea visible.
- 17.- Recoger “la medusa” con una pipeta *Pasteur* de vidrio (Brand GmbH & Co., Wertheim, Alemania) previamente esterilizada y con el extremo en forma de gancho, y realizar dos lavados consecutivos en tubos con etanol frío al 70%.
- 18.- Dejar secar al aire durante unos segundos para eliminar los restos de etanol.
- 19.- Resuspender en Tris-EDTA (1:0,1 a pH 8) o en agua destilada estéril. El volumen añadido dependerá del tamaño de “la medusa” de ADN obtenido.
- 20.- Agitar suavemente a temperatura ambiente durante 24 horas, o durante dos horas a 37°C, hasta la perfecta disolución del ADN.

Método automatizado

- 1.- Partiendo de 1 ml de sangre periférica, el sistema añade:
 - 0,115 ml de solución de *proteínasa K*,
 - 0,84 ml de *tampón de lisis-unión*, para favorecer la lisis celular y generar las condiciones salinas adecuadas para la posterior retención del ADN, y
 - 0,54 ml del reactivo *MGP*, que retiene el ADN a través de las partículas cristalinas magnéticas que contiene.
- 2.- Lavado con 2,42 ml de *Solución de Lavado I* para eliminar todo aquello que no se haya unido a las partículas magnéticas (proteínas, membranas celulares e inhibidores de amplificación como la heparina).
- 3.- Lavado con 1,28 ml de *Solución de Lavado II* para retirar los restos celulares y reducir la concentración salina.
- 4.- Nuevo lavado con 0,84 ml de *Solución de Lavado III* para eliminar los restos de etanol.

5.- Finalmente, se resuspende el ADN purificado en 200 µl de tampón de disolución previamente calentado.

2.2. A partir de tejido congelado

Se cortaron entre 15 y 20 secciones de 20 µm de grosor para cada una de las muestras incluidas en el estudio mediante el uso de un criostato (Leica Microsistemas, Barcelona, España). La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de extracción comercial *Dneasy Tissue Kit* (Qiagen, Chatswoth, CA, EEUU), con algunas modificaciones detalladas a continuación:

- 1.- Sumergir los cortes de tejido incluidos en O.C.T. en 200 µl de solución *ATL*.
- 2.- Añadir 20 µl de *proteínasa K*. Mezclar con ayuda de un agitador e incubar en un termobloque con agitación a 55°C hasta que el tejido esté completamente lisado. El tiempo de incubación puede variar entre 3 horas y toda la noche.
- 3.- Agitar de nuevo y añadir 200 µl de solución *AL*. Mezclar e incubar a 70°C durante 10 minutos.
- 4.- Añadir 200 µl de etanol absoluto y homogeneizar.
- 5.- Pasar la mezcla a la columna suministrada en el kit y colocada en un tubo recolector. Centrifugar a 8.000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo recolector con el sobrenadante.
- 6.- Colocar la columna en un nuevo tubo recolector y añadir 500 µl de la solución *AW1*. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo recolector con el sobrenadante.
- 7.- Situar la columna en un tercer tubo recolector y añadir 500 µl de la solución *AW2*. Centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos para secar completamente la membrana de la columna. Descartar el tubo recolector con el sobrenadante.
- 8.- Colocar la columna en un tubo limpio y marcado convenientemente. Añadir 200 µl de agua destilada, directamente sobre la membrana, e incubar a temperatura ambiente (entre 15 y 20°C) durante 1 minuto. Centrifugar durante 1 minuto para eluir el ADN. Opcionalmente, la elución se puede llevar a cabo utilizando menos volumen de agua si se espera obtener poca cantidad de ADN.
- 9.- Cuantificar el ADN mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EEUU), partiendo de 1 µl de muestra. En aquellos casos en los que la concentración sea superior a 1 µg/µl,

preparar una dilución 1/10 y utilizar 1 µl de ésta para realizar la cuantificación y evitar una posible saturación de la medida. Congelar el volumen restante a -20°C hasta su utilización.

2.3. A partir de tejido embebido en parafina

Mediante un microtomo (Leica Microsistemas, Barcelona, España), se obtuvieron 4 secciones de 30 µm por cada muestra, y se introdujeron en tubos de 1,5 ml. El protocolo de extracción empleado fue similar al de extracción a partir de tejido congelado pero incluyendo los siguientes pasos previos para la desparafinación de la muestra:

- 1.- Colocar los cortes de parafina en un tubo de 1,5 ó 2 ml.
- 2.- Añadir 600 µl de xilol y mezclar en un agitador.
- 3.- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Retirar el sobrenadante con una pipeta sin arrastrar el *pellet*.
- 5.- Repetir el lavado con xilol (pasos del 2 al 4).
- 6.- Añadir 1.000 µl de etanol absoluto al *pellet* para eliminar los residuos de xilol y mezclar en el agitador.
- 7.- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Retirar el etanol con una pipeta sin arrastrar el *pellet*.
- 9.- Repetir el lavado con etanol (pasos del 6 al 8).
- 10.- Incubar el *pellet* con el tubo abierto a 37°C durante 10-15 minutos (hasta que los restos de etanol se evaporen).
- 11.- Continuar con el protocolo de extracción de ADN de tejido congelado desde el paso 1.

3. EXTRACCIÓN DE ARN

3.1. A partir de tejido congelado

La extracción de ARN total (ARNt) procedente de las muestras congeladas se llevó a cabo a partir de 15-20 secciones de 20 µm de grosor obtenidas en un criostato. El método empleado fue el descrito en el protocolo *TRI Reagent®* (Molecular Research Centre, Cincinnati, OH, EEUU):

- 1.- Homogeneizar las secciones de tejido (50-100 mg aproximadamente) en 1 ml de solución *TRI Reagent*. Dejar a temperatura ambiente durante 5-15 minutos.
- 2.- Añadir 0,2 ml de cloroformo. Mezclar vigorosamente.
- 3.- Centrifugar durante 15 minutos a 4°C y a 13.500 rpm.
- 4.- Recuperar la fase acuosa y añadir 0,5 ml de isopropanol. Mezclar y dejar a 20°C toda la noche. Centrifugar durante 20 minutos a 4°C y a 13.500 rpm.
- 5.- Descartar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 75%. Centrifugar durante 5 minutos a 4°C y a 13.500 rpm.
- 6.- Secar el *pellet* durante 3-5 minutos a 65°C.
- 7.- Resuspender en 12-15 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).
- 8.- Agitar suavemente en un termobloque a 37°C durante 20 minutos.
- 9.- Utilizar 1 µl del ARN obtenido para su cuantificación mediante un NanoDrop. Simultáneamente, testar 1 µl del ARN mezclado con 4 µl de agua tratada con DEPC y 5 µl de formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) en un gel de agarosa *MetaPhor* (BioWhitaker Molecular Applications, Rockland, ME, EEUU), al 1,5%. Congelar el volumen restante a -80°C hasta su utilización.

Las muestras de ARNt que presentaban un perfil degradado en la electroforesis en gel de agarosa (ARN mensajero <500 pares de bases), fueron extraídas por segunda vez para descartar cualquier incidencia en el manejo del material biológico.

3.2. A partir de tejido embebido en parafina

La extracción de ARNt procedente de tejido parafinado se llevó a cabo mediante el kit *miRNeasy FFPE* (Qiagen, Chatswoth, CA, EEUU) siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial y especificado a continuación:

- 1.- Cortar en un microtomo 4 secciones de 30 µm cada una y depositarlas en un tubo de 1,5 ml.
- 2.- Añadir 1ml de xilol y agitar a temperatura ambiente durante 10 segundos.
- 3.- Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 minutos a 20-25°C. Descartar el sobrenadante evitando tocar el *pellet*.
- 4.- Añadir 1 ml de etanol absoluto y mezclar en un agitador.

- 5.- Centrifugar de nuevo a 13.000 rpm durante 2 minutos a 20-25°C. Eliminar el sobrenadante evitando tocar el *pellet*.
- 6.- Destapar el tubo e incubar a 37°C durante 10 minutos o hasta que el etanol residual se haya evaporado.
- 7.- Resuspender el *pellet* en 240 µl de solución *PKD* y añadir 10 µl de *proteínasa K*. Mezclar con un agitador.
- 8.- Incubar a 55°C durante 15 minutos y posteriormente a 80°C durante 15 minutos.
- 9.- Añadir 500 µl de solución *RBC* y mezclar con un agitador.
- 10.- Transferir la mezcla a una columna *gDNA Eliminator spin* (suministrada por el kit) y situar ésta en un tubo recolector de 2 ml. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 rpm. Desechar la columna y conservar el volumen recolectado.
- 11.- Añadir 1.750 µl de etanol absoluto al volumen recolectado y mezclar con la pipeta. Realizar el siguiente paso inmediatamente.
- 12.- Transferir 700 µl del volumen, incluyendo cualquier precipitado que se pueda haber formado, a una columna *RNeasy MiniElute spin* y colocar ésta en un tubo recolector de 2 ml. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm. Desechar el sobrenadante. Repetir hasta hacer pasar todo el volumen de la muestra por la columna.
- 13.- Añadir 500 µl de solución *RPE* a la columna. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 15 segundos a 10.000 rpm para lavar la membrana de la columna. Descartar el líquido eluido.
- 14.- Añadir otros 500 µl de solución *RPE* a la columna. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 2 minutos a 10.000 rpm.
- 15.- Colocar la columna en un tubo recolector de 2 ml. Abrir la tapa de la columna y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos. Descartar el tubo recolector.
- 16.- Colocar la columna en un tubo recolector de 1,5 ml. Añadir de 14-30 µl de agua libre de ARNasas directamente sobre la membrana de la columna. Cerrar la tapa suavemente y centrifugar durante 1 minuto a 13.000 rpm. Guardar el ARN obtenido a -80°C hasta su utilización.

3.3. Análisis de la integridad del ARN

Para todas aquellas muestras obtenidas a partir de tejido congelado, que mostraron un perfil óptimo en el gel de agarosa, se llevó a cabo un control de calidad mediante una valoración de su integridad. Para ello se empleó el Bioanalizador 2100 de Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). Este analizador estima la integridad del ARN en función de un algoritmo denominado *RNA Integrity Number* (RIN), que se corresponde con el valor cuantificable de integridad otorgado por el programa informático de Agilent. El RIN puede tener valores comprendidos entre 0 y 10, siendo 10 el correspondiente a la máxima calidad. Solo aquellas muestras con un valor de RIN igual o superior a 7 (recomendación del fabricante) fueron seleccionadas para el estudio de expresión. Un ejemplo del perfil obtenido en el bioanalizador para un ARNt se muestra en la Figura 3.

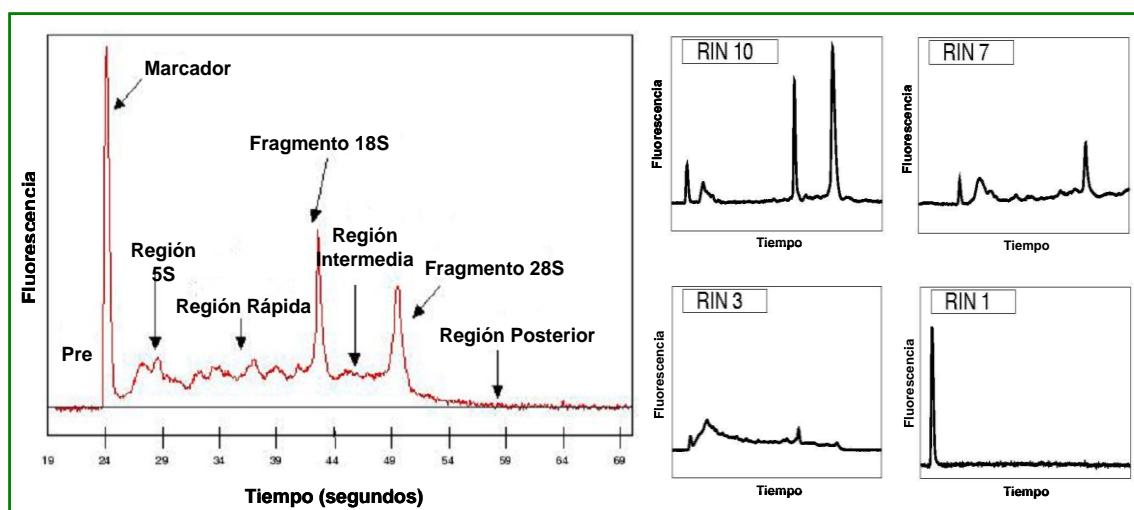


Figura 3. Representación del perfil generado por el bioanalizador de Agilent. Gráficas de los distintos perfiles de integridad del ARN. Un RIN de 10 representa la máxima integridad, 7 óptima, y 1 y 3 corresponden a ARN degradado.

4. ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES

El ADN extraído a partir de sangre periférica fue utilizado para la caracterización genética de los cinco genes principalmente implicados en la enfermedad: *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC* y *SDHD*. En los pacientes negativos para mutaciones en dichos genes, se analizaron además dos de los genes recientemente implicados en el desarrollo de PCC/PGL: *SDH5* [42] y *TMEM127* (comunicación personal de la Dra. Patricia Dahia). Dado que ninguno de los

pacientes incluidos en el estudio mostró signos clínicos o antecedentes familiares de NF1 o MEN1, los genes correspondientes no fueron estudiados.

En cuanto al estudio genético de los tumores, tanto congelados como parafinados, éste se limitó a los principales genes de susceptibilidad: *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC* y *SDHD*; con la excepción de los casos congelados con antecedentes familiares, en los que además se estudió *TMEM127*. Por último, cuatro de los tumores empleados en el estudio de perfiles de expresión procedían de pacientes con mutaciones germinales conocidas en *NF1*.

4.1. Amplificación por PCR

El estudio de mutaciones puntuales incluía las regiones codificantes completas (exones) y las implicadas en el procesamiento post-transcripcional (regiones esenciales de *splicing*) del ARN mensajero (ARNm) de los genes *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* y *SDH5*, así como los exones asociados a la enfermedad en el caso del gen *RET* (10, 11, 15 y 16). El análisis se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo cual se diseñaron parejas de *primers* específicos que flanqueaban las regiones de interés. La secuencia del ADN correspondiente a cada gen se obtuvo de la base de datos *Ensembl* (Ensembl release 45; http://www.emsembl.org/Homo_sapiens/) y el diseño de los *primers* se efectuó mediante la herramienta bioinformática *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). En todos los casos, se comprobó que la secuencia correspondiente al sitio de unión de los *primers* no presentara polimorfismos y que el producto de la amplificación fuera específico, empleando a tal efecto la herramienta *PCR in-silico* disponible en el buscador *UCSC* (University of California Santa Cruz; <http://genome.brc.mcw.edu/>). Las condiciones de las PCRs, el tamaño de los amplicones y la secuencia de los *primers* empleados se detalla en la Tabla 1MS de material suplementario.

Para cada reacción de PCR se incluyó un tubo sin ADN, usado como control de una posible contaminación. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, que contenía: 100 ng de ADN genómico, un 10% del volumen final de solución de PCR 10X (cloruro potásico 50 mM, Tris 10 mM y cloruro de magnesio 1,5 mM), 200 mM de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP; Fermentas-Life Sciences, Ontario, Canadá), 20 pmoles de cada uno de los *primers* específicos y 1 unidad de *Taq Polimerasa* (Laboratorio de Terapias Experimentales del CNIO, Madrid, España).

Las reacciones se llevaron a cabo en termocicladores Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Las muestras, una vez amplificadas, fueron testadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España). Los tamaños de los productos amplificados fueron comparados con el marcador de peso molecular *PhiX174* digerido con *HaeIII* (Biotools, Madrid, España). Los productos amplificados que presentaban el tamaño esperado fueron posteriormente purificados y secuenciados.

4.2. Purificación de los fragmentos amplificados

Para eliminar los restos de *primers* y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación, se empleó el kit comercial *E.Z.N.A Cycle-Pure kit* (Omega Bio Tek, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante:

- 1.- Transferir el producto de PCR a un tubo limpio de 1,5 ml y añadir 5 volúmenes de solución *CP*. Homogeneizar la mezcla.
- 2.- Colocar una columna *HiBind* (suministrada con el kit) en un tubo de 2 ml e introducir la mezcla. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto y descartar el líquido recogido en el tubo.
- 3.- Lavar la columna añadiendo 700 µl de tampón de lavado. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto y descartar de nuevo el líquido recogido en el tubo de recolección.
- 4.- Realizar un segundo lavado con 700 µl de solución de lavado y centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Descartar el líquido.
- 5.- Centrifugar de nuevo a 13.000 rpm durante 1 minuto para eliminar los restos de solución de lavado que impregnen la columna.
- 6.- Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y añadir agua destilada precalentada a 70°C directamente sobre la membrana (el volumen de elución empleado dependerá de la cantidad de amplificado de la que se parta). Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.

4.3. Secuenciación de los fragmentos purificados

Los productos de PCR, previamente purificados, fueron secuenciados de forma automática en la Unidad de Genómica del CNIO, utilizando para ello terminadores fluorescentes *Big DyeTM* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y un secuenciador multicapilar ABI modelo 3730 (Applied Biosystems,

Foster City, CA, EEUU). La secuencia de nucleótidos obtenida fue posteriormente visualizada para su valoración mediante el programa informático *Finch TV v1.4* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

4.4. Análisis de grandes deleciones

Se analizó la presencia de reordenamientos germinales (ganancias o grandes deleciones) de los genes *VHL*, *SDHB*, *SDHC* y *SDHD* mediante la utilización de la técnica comercial *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands; <http://www.mrc-holland.com>). En el caso de los genes *SDH* también se llevó a cabo el análisis mediante *PCR-Multiplex* [80]. Para ello, se emplearon parejas de *primers* específicos para cada exón de cada uno de los tres genes, incluyendo como controles varios amplicones correspondientes a distintas regiones cromosómicas. En el caso de encontrar un patrón que indicase la existencia de una gran deleción, se diseñaron *primers* alternativos para la región de interés, que fueron utilizados en un ensayo de PCR-multiplex distinto (Tabla 2MS de material suplementario).

MLPA

El protocolo empleado para el análisis de estos genes fue el recomendado por la casa comercial, con una mezcla de sondas específicas para cada caso: *VHL* (*SALSA Probe-mix P016*) y *SDH* (*SALSA Probe-mix P226*):

A) Desnaturalización e hibridación

- 1.- Diluir el ADN con agua bidestilada estéril hasta un volumen de 5 µl por cada muestra. La cantidad de ADN necesaria para cada reacción oscila entre 20 y 500 ng, siendo el óptimo 100 ng.
- 2.- Calentar durante 5 minutos a 98°C en un termociclador y atemperar inmediatamente a 25°C.
- 3.- Añadir 1,5 µl de *SALSA Probe-mix* y 1,5 µl de *MLPA buffer*.
- 4.- Mezclar e incubar en un termociclador durante 1 minuto a 95°C y posteriormente durante 16 horas a 60°C.

B) Reacción de ligación

5.- Preparar la mezcla de ligación como se detalla a continuación:

Mezcla de ligación	
Reactivo	Volumen (μl)
<i>Ligase 65 buffer A</i>	3
<i>Ligase 65 buffer B</i>	3
Agua bidestilada	25
<i>Ligase 65</i>	1
V total (por muestra)	32

6.- Antes de añadir la mezcla de ligación, reducir la temperatura del termociclador hasta 54°C y a esta temperatura añadir los 32 μl de la mezcla.

7.- Incubar durante 10-15 minutos a 54°C e incubar a continuación 5 minutos a 98°C.

C) *Reacción de PCR*

8.- En tubos nuevos añadir la siguiente mezcla:

Mezcla de PCR 1	
Reactivo	Volumen(μl)
<i>10x SALSA PCR buffer</i>	4
Agua bidestilada	26
Reacción de ligación	10
V total (por muestra)	40

9.- Preparar la siguiente mezcla:

Mezcla de PCR 2	
Reactivo	Volument(μl)
<i>SALSA PCR primers</i>	2
<i>SALSA Enzyme Dilution Buffer</i>	2
Agua bidestilada	5,5
<i>SALSA Polymerase</i>	0,5
V total (por muestra)	10

10.- Poner los tubos en el termociclador y mientras están a 60°C añadir 10 μl de la mezcla de PCR 2 a cada tubo conteniendo la mezcla de PCR 1 e iniciar la reacción.

Condiciones de la PCR:

- 30 segundos a 95°C
 - 30 segundos a 60°C
 - 60 segundos a 72°C
 - Extensión final durante 20 minutos a 72°C
- 33 ciclos

D) *Test*

11.- Testar la reacción de PCR en un gel de agarosa al 2,5%.

E) *Visualización de los resultados*

12.- Para cada muestra se prepara una mezcla con: 14 µl de formamida, 0,1 µl de marcador de peso molecular *LIZ* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y 1 µl del producto final de PCR (la cantidad de producto dependerá de la eficiencia de la amplificación).

13.- Separar los distintos fragmentos obtenidos en un secuenciador *ABI Prism™ 3700* (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Warrington, UK) y analizar posteriormente utilizando el programa informático *Peak Scanner v.1.0* (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Warrington, UK). La normalización de los datos se llevó a cabo solapando cada muestra analizada con una muestra control (sin alteraciones), determinándose de este modo la superficie del pico obtenida para cada fragmento y normalizando esta en función de la de los picos control [101].

PCR-Multiplex

Para el estudio de los genes *SDH*, se llevó a cabo alternativamente un análisis de grandes deleciones utilizando para ello el kit comercial *Multiplex PCR* (Qiagen, Chatswoth, CA, EEUU). Las parejas de *primers* específicas para los genes *SDHB*, *SDHC* y *SDHD* fueron diseñadas en base a sus respectivas secuencias genómicas obtenidas a partir de la base de datos del proyecto *Ensembl* (Tabla 2MS de material suplementario). La reacción de *PCR-Multiplex* incluía además varias parejas de *primers* complementarios a distintas regiones cromosómicas que fueron empleadas como control interno del ensayo (cromosomas 1, 3 y 11). En

cada caso, el *primer* directo se marcó con un fluoróforo (5' 6-FAM) para su posterior detección. El protocolo empleado fue el siguiente:

1.- Preparar por cada muestra una mezcla con: 1 µl de ADN (100-200 ng), 9 µl de agua bidestilada estéril, 12,5 µl de *Multiplex PCR Master Mix* y 2,5 µl de mezcla de primers conteniendo 0,2 µM de cada primer marcado.

2.- Activar la enzima, *HotStartTaq DNA polymerase*, en un termociclador a 95°C durante 15 minutos.

3.- Amplificar mediante PCR empleando las siguientes condiciones:

- 30 segundos a 94°C
 - 90 segundos a 60°C
 - 90 segundos a 72°C
- 20 ciclos
- Extensión final durante 10 minutos a 72°C

4.- Testar los productos de PCR en un gel de agarosa al 3%.

5.- Separar los distintos fragmentos obtenidos en un secuenciador y analizar del mismo modo que las reacciones de MLPA (Figura 4).

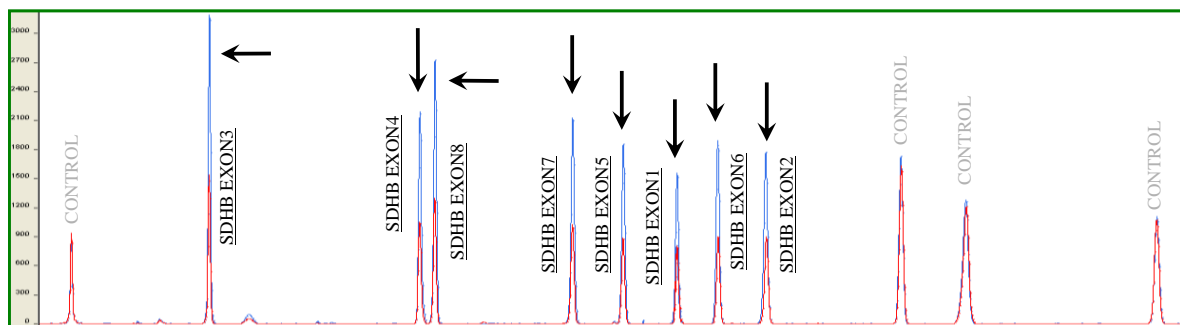


Figura 4. Ejemplo de visualización de un ensayo de PCR-Multiplex para el gen *SDHB*, utilizando el software *Peak Scanner* para el análisis de fragmentos. Las flechas indican los exones del gen *SDHB*.

4.5. Estudio de haplotipos

Se llevó a cabo un estudio de haplotipos para determinar si las mutaciones en los genes *SDH* más frecuentes en nuestra población, se debían a la existencia de un efecto fundador. Las mutaciones estudiadas fueron: c.166_170delCCTCA y c.1-10413_73-3866del en el gen *SDHB*; y c.334_337delACTG y c.129G_A en el gen *SDHD*. A los 17 *probandus* positivos para estas mutaciones detectados en nuestra población, se añadieron 9 familias independientes (6 con la mutación c.129G_A y 3 con la mutación c.334_337delACTG), procedentes del Hôpital Georges Pompidou de Paris y del Institut de Recerca Biomèdica de Lleida. En el

caso de las mutaciones en *SDHB*, la distribución de los haplotipos se determinó mediante la amplificación y la posterior secuenciación de 5 polimorfismos (SNPs) que definían un bloque de desequilibrio de ligamiento (LD) dentro del *locus* del gen: rs2235930, rs7550829, rs2746467, rs10887990 y rs4920653. Los 5 SNPs fueron seleccionados utilizando la herramienta *Tagger* del *Haploview software Packaged* [102]. Los bloques de LD y los haplotipos observados se infirieron previamente basados en la información contenida en el Proyecto *HapMap* para la población caucásica europea (HapMap-CEU; <http://www.hapmap.org/downloads/index.html.en>). Se utilizaron 2 marcadores microsatélite adicionales (D1S2697 y GATA29A05), que flanqueaban a los 5 SNPs elegidos, para estimar con una mayor fiabilidad la frecuencia del haplotipo que contenía la mutación. Esto se llevó a cabo tanto en los portadores de las mutaciones de interés como en 100 controles españoles sanos, lo cual permitió establecer cuáles eran los haplotipos más frecuentes en nuestra población. En cuanto a las mutaciones en *SDHD*, se analizaron 5 marcadores microsatélite localizados en el locus cromosómico 11q23: D11S1793, D11S4078, D11S1987, D11S1786, y D11S1885, tanto en los portadores de las mutaciones estudiadas como en 100 controles españoles sanos. Finalmente, se usó el software *PHASE* para la reconstrucción de los haplotipos en la población control española (<http://www.stat.washington.edu/stephens/phase.html>).

5. PERFILES DE EXPRESIÓN DE TUMORES

El estudio de los perfiles de expresión de los tumores congelados disponibles se llevó a cabo mediante una hibridación competitiva entre el ARN tumoral (marcado con un fluoróforo rojo) y un ARN universal de referencia (marcado con un fluoróforo verde) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) sobre una plataforma comercial de ADN complementario (ADNc) (*Whole Human Genome Microarray*, formato 4x44k). Dicha plataforma contiene aproximadamente 41.000 sondas únicas que representan los 22.000 genes que conforman el genoma humano completo. Mediante este método, y partiendo del ARNt, se genera un ARN complementario (ARNc) fluorescente que es utilizado finalmente para la hibridación competitiva en la que se detectan: los genes que están sobre-expresados (de color rojo) y los que están sub-expresados (de color verde) en la muestra correspondiente.

5.1. Amplificación, marcaje, e hibridación del ARN

El protocolo empleado, con alguna modificación con respecto al recomendado por la casa comercial, se detalla a continuación (Figura 5):

Retrotranscripción: síntesis de ADNc a partir del ARNt

- 1.- Disponer 800 ng de ARNt procedente de cada muestra (incluido el ARN de referencia) en tubos de 0,5 ml.
- 2.- Añadir 0,8 µl de *T7 promoter primer* y llevar el volumen de cada muestra hasta 5,8 µl con agua bidestilada estéril libre de nucleasas.
- 3.- Desnaturalizar durante 10 minutos a 65°C en un termociclador.
- 4.- Colocar los tubos durante 5 minutos en hielo.
- 5.- Preparar el *cDNA Master Mix* para cada muestra. Mezclar suavemente los componentes, añadiéndolos en el orden indicado y pipeteando a temperatura ambiente. Precalentar el *5x FS Buffer* durante 3-4 minutos a 80°C.

<i>cDNA Master Mix</i>	
Reactivos	Volumen (µl)
<i>5x Fisrt Strand Buffer</i>	2
0,1M <i>DTT</i>	1
10mM <i>dNTP mix</i>	0,5
<i>MMLV RT</i>	0,6
<i>RnaseOUT</i>	0,3
V total (por muestra)	4,4

- 6.- Añadir 4,4 µl de *cDNA Master Mix* a cada muestra. Mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas.
- 7.- Incubar las muestras durante 2 horas a 40°C en un termociclador.
- 8.- Calentar durante 15 minutos a 65°C para inactivar la enzima *MMLV-RT*.
- 9.- Colocar las muestras durante 5 minutos en hielo.
- 10.- Centrifugar brevemente para decantar todo el contenido.

Incorporación de los fluoróforos: síntesis del ARNc fluorescente

- 11.- Precalentar la solución *PEG* al 50% a 40°C de temperatura.
- 12.- Añadir 0,5 µl de fluoróforo Cy5-CTP a la muestra y 0,5 µl de Cy3-CTP a la referencia.

13.- Preparar el *Transcription Master Mix*. Mezclar los componentes suavemente, añadiéndolos en el orden indicado y a temperatura ambiente.

<i>Transcription Master Mix</i>	
Reactivos	Volumen (µl)
Agua libre de nucleasas	3,83
<i>4x transcription buffer</i>	5,00
0,1 <i>DTT</i>	1,50
<i>NTP Mix</i>	2,00
50% <i>PEG</i>	1,60
<i>RnaseOUT</i>	0,12
<i>Inorganic Pyrophosphate</i>	0,15
<i>T7 RNA Polymerase</i>	0,30
V total (por muestra)	14,50

14.- Añadir a cada muestra los 14,5 µl de *Transcription Master Mix*. Mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas.

15.- Incubar las muestras durante 2 horas a 40°C en un termociclador.

Purificación del ARNc marcado (*RNeasy Mini Kit*; Qiagen, Chatswoth, CA, EEUU)

16.- Añadir 75 µl de agua libre de nucleasas a cada muestra de ARNc hasta obtener un volumen total de 100 µl.

17.- Añadir 10 µl de β-mercaptoetanol (BME) por cada ml de solución *RLT* antes de usar.

18.- Añadir 350 µl de la solución de *RLT*+BME a cada muestra y mezclar bien.

19.- Añadir 250 µl de etanol al 100% y mezclar con la pipeta.

20.- Transferir 700 µl de la muestra de ARNc a una columna colocada en un tubo recolector de 2 ml.

21.- Centrifugar las columnas a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4°C. Descartar el volumen obtenido en el tubo recolector.

22.- Añadir 500 µl de solución *RPE* a cada columna. Centrifugar las muestras a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4°C. Descartar el volumen del tubo recolector.

23.- Añadir de nuevo 500 µl de solución *RPE* a cada columna. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos a 4°C. Descartar el volumen del tubo recolector. Centrifugar las columnas durante 30 segundos adicionales a 4°C y 13.000 rpm para eluir el tampón de lavado residual.

24.- Eluir el ARNc en un nuevo tubo recolector utilizando 20 µl de agua libre de ARNasas. Esperar 1 minuto antes de centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos.

25.- Repetir el paso anterior sin retirar el volumen inicialmente eluido. El volumen final tiene que ser 40 µl.

Cuantificación del ARNc marcado

26.- Medir la concentración del ARNc utilizando el espectrofotómetro NanoDrop en el módulo *microarray measurement*. Este método calcula la actividad específica de los fluoróforos y únicamente si ésta se encuentra entre 7-15 pmol/µg se continuará con la hibridación.

Hibridación

27.- Mezclar en un nuevo tubo, 1 µg de ARNc de cada muestra con 1 µg de ARNc de la referencia.

28.- Añadir 4 µl de 10x *Bloquing Agent* por muestra.

29.- Añadir 1,8 µl de *Fragmentation Buffer*.

30.- Completar hasta 45 µl con agua tratada con DEPC.

31.- Mezclar en un agitador e incubar durante 30 minutos a 60°C en un termobloque.

32.- Añadir 45 µl de *Hybridization Buffer*. El volumen final por cada muestra debe ser 90 µl.

33.- Colocar un cubreobjetos dentro de la cámara de hibridación (*Agilent label up*, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU).

34.- Dispensar los 90 µl de la solución.

35.- Depositar con cuidado el cristal (*microarray*), con la parte impresa hacia abajo, sobre el cubreobjetos previamente cargado con la muestra. Evitar la formación de burbujas para la correcta distribución de la muestra sobre el cristal.

36.- Colocar la tapa de la cámara de hibridación y sellar de forma estanca. Hibridar a 65°C durante 17 horas y con rotación a 10 rpm.

Lavados post-hibridación

37.- Abrir la cámara con cuidado sobre una superficie plana.

38.- Sacar el cristal sujetándolo por el extremo en el que se encuentra el código de barras. Mantener el cristal con el cubreobjetos hacia abajo, evitando el secado del cristal.

- 39.- Sumergir el cristal en un baño con *wash buffer solution 1*.
- 40.- Separar el cubreobjetos cuidadosamente, haciendo palanca por el extremo con el código de barras.
- 41.- Repetir este mismo procedimiento con todos los cristales.
- 42.- Lavar los cristales con *wash buffer solution 1* durante 1 minuto a temperatura ambiente y en un agitador magnético.
- 43.- Transferir los cristales a *wash buffer solution 2*, previamente precalentado durante toda la noche a 37°C. Lavar los cristales durante 1 minuto con agitación.
- 44.- Sacar la cesta con los cristales y escurrir sobre un papel de filtro para secar el exceso de solución de lavado.
- 45.- Transferir los cristales a un recipiente con acetonitrilo (solución de secado) y dejar durante 1 minuto. Sacar de esta solución lentamente y a velocidad constante.
- 46.- Dejar los cristales en la caja a tal efecto y cubrir con *parafilm* (Alcan Global Pharmaceutical Packaging Inc, Wisconsin, EEUU) para minimizar el contacto con el aire. Intentar evitar en lo posible la exposición a la luz hasta que se lleve a cabo el escaneo. Escanear inmediatamente.

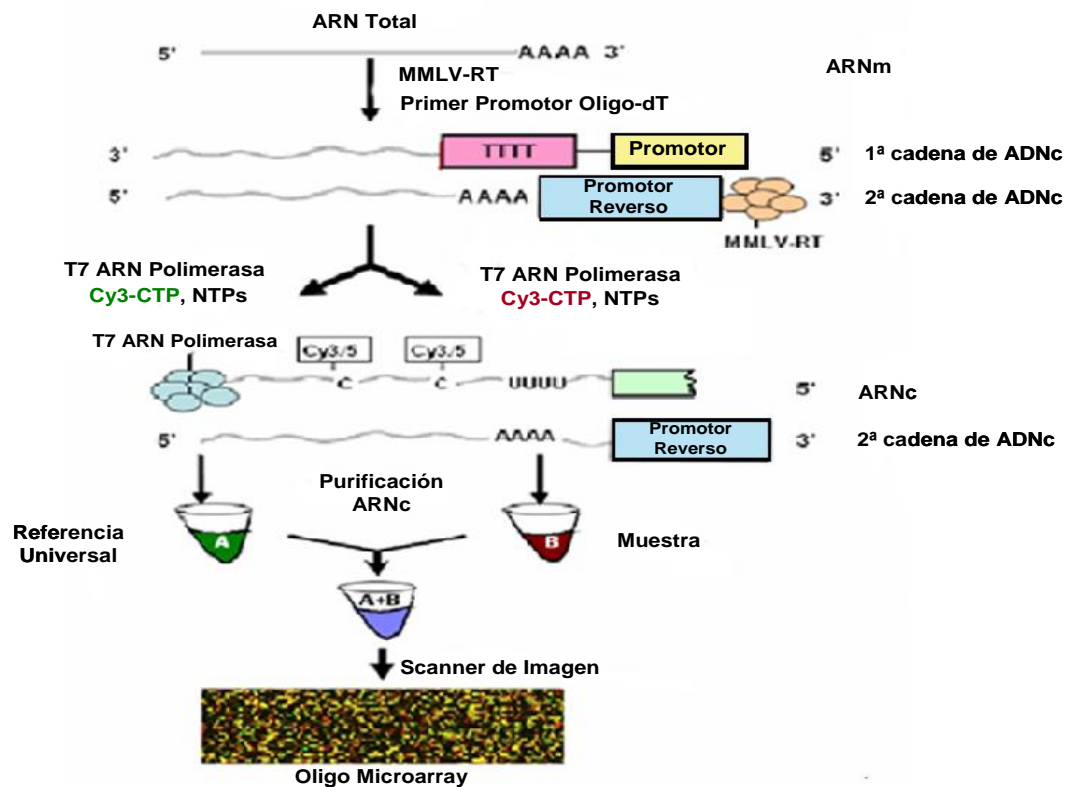


Figura 5. Esquema del proceso de amplificación, marcaje e hibridación para un experimento de *microarray* de dos colores.

5.2. Obtención de las imágenes del microarray

La fluorescencia emitida tras la hibridación es capturada mediante un escáner confocal modelo G2565 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), disponible en la Unidad de Genómica del CNIO. Todo el proceso se lleva a cabo en una cámara libre de ozono para evitar la degradación del fluoróforo Cy5. Las imágenes se obtienen en modo *XDR*, el cual consta de dos imágenes del mismo *microarray*: la imagen escaneada a alta intensidad y la escaneada a baja intensidad.

5.3. Análisis de los datos

5.3.1. Extracción de los datos de la imagen

Para el análisis de la imagen y la extracción de los datos se empleó el paquete informático *Feature Extraction* v.9.5 de Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), utilizando el protocolo de extracción recomendado para esta plataforma (GE2-v5_95_Feb07). Con las dos imágenes obtenidas se realizó una extracción de los datos en la que se integraron los valores obtenidos para cada una. Este protocolo, elimina los puntos de baja calidad y obtiene los valores de expresión para cada uno de los clones a partir de los valores de fluorescencia extraídos. El programa permite a su vez, evaluar la calidad de la hibridación y descartar aquellos cristales que no cumplan con el criterio impuesto por la casa comercial para asegurar la correcta realización del experimento.

5.3.2. Normalización

Tras un primer filtrado de los datos con el programa *Feature Extraction*, se empleó el método *normexp* [103] para minimizar el fondo generado. La normalización se llevó a cabo en el entorno de programación estadístico *R* (<http://www.r-project.org/>) empleando la librería *limma* [104] disponible públicamente a través de *Bioconductor* (Bioconductor project, <http://www.bioconductor.org>). La normalización de los datos de expresión se realizó tanto intra-array (*loess*) como inter-array (*quantiles*) (Figura 6a).

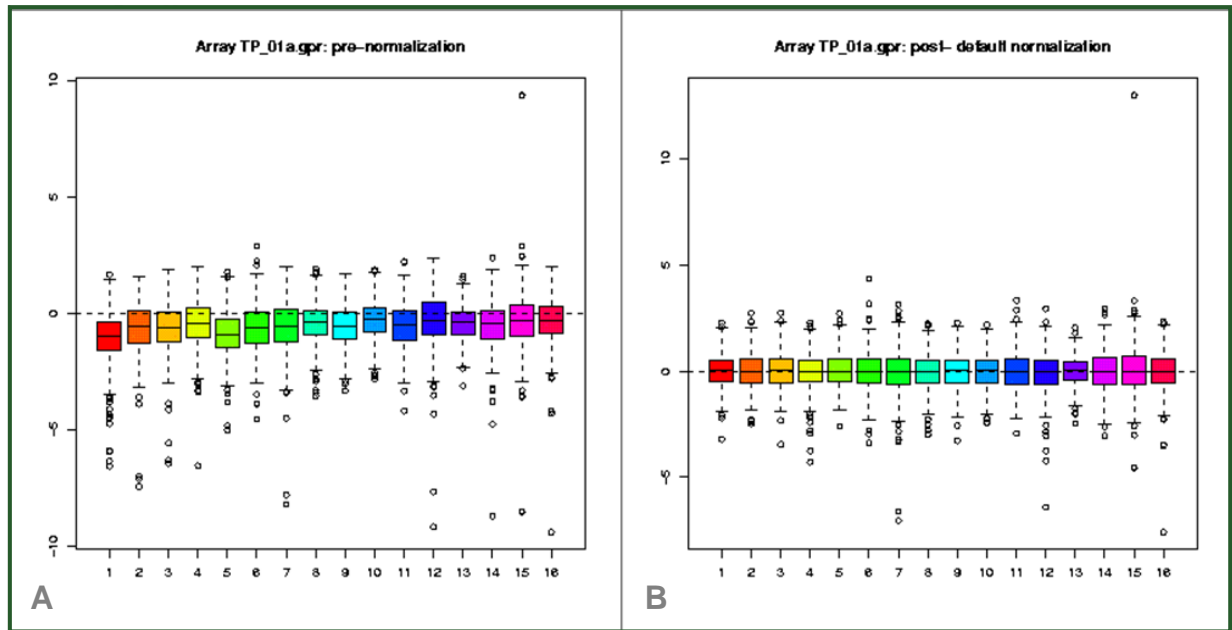


Figura 6a. Representación gráfica del proceso de normalización de los datos obtenidos del *microarray*. A) Estado de las muestras previo a la normalización. B) Estado de las muestras tras el proceso de normalización.

5.3.3. Preprocesado de los datos

Los valores, una vez normalizados, fueron preprocesados mediante una herramienta incluida dentro del paquete informático *Gene Expression Pattern Analysis Suite New Release v3.1* (GEPAS, <http://www.gepas.org>) [105], mantenido por el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF). Con esta herramienta se eliminaron las replicas inconsistentes de un mismo gen, es decir aquellas con una distancia máxima a la mediana del conjunto de réplicas ≥ 1 . Así mismo, se agruparon las réplicas o clones idénticos del mismo gen de acuerdo al valor de la mediana del conjunto de las réplicas y se eliminaron los patrones planos, desechando todos aquellos clones cuya desviación estándar (SD) de los datos fuera < 1 . Finalmente se estandarizaron estos datos (Figura 6b).

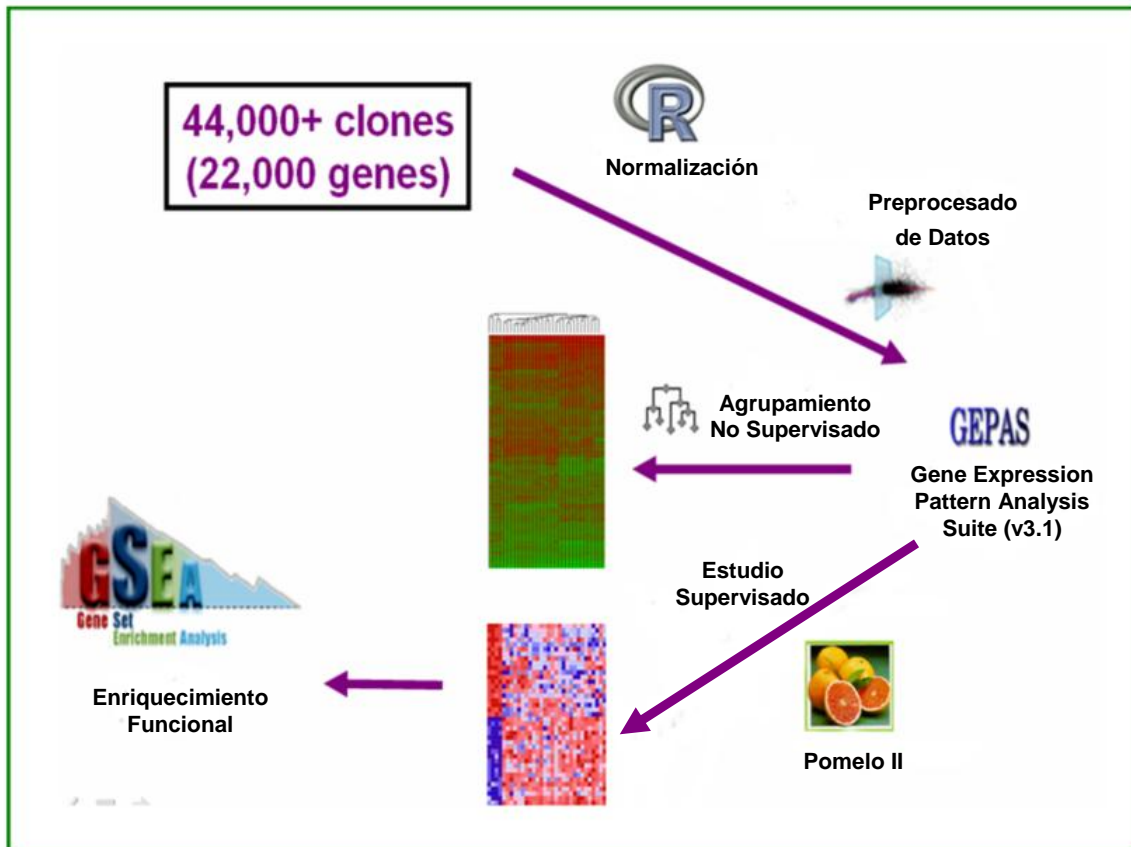


Figura 6b. Esquema representativo del análisis de datos de los *microarrays*.

5.3.4. Agrupamiento No Supervisado

Con objeto de agrupar inicialmente los tumores en función de sus niveles globales de expresión, se emplearon algoritmos jerárquicos de agrupamiento disponibles en el paquete informático *Gene Cluster* (<http://rana.stanford.edu/software>). La visualización del resultado de este análisis se llevó a cabo utilizando el visor *Java TreeView* (<http://jtreeview.sourceforge.net/>).

Para confirmar los resultados de este agrupamiento, se empleó el algoritmo de *clustering* robusto denominado *Consensus Clustering* [106]. Este método emplea un amplio rango de algoritmos (jerárquicos, k-medias, mapas de Kohonen, etc) junto con técnicas de re-muestreo e introduce perturbaciones en los datos originales y, a través de múltiples agrupaciones (Ej. 100 re-muestreos), es capaz de estimar el número óptimo de agrupamientos presentes en los datos y detectar la robustez de dichos agrupamientos. Los agrupamientos más estables resultantes de las múltiples interacciones entre los distintos parámetros fueron definidos y empleados en subsiguientes análisis.

Se llevaron a cabo otros estudios no supervisados utilizando para ello una lista de genes diana de HIF recientemente descritos [107]. La lista incluía tanto genes dianas confirmados (58) como potenciales dianas (500), y se utilizó para eliminar los patrones planos una $SD=0,8$.

5.3.5. Análisis Supervisado

Con el fin de encontrar listas de genes diferencialmente expresados entre las distintas clases genéticas de tumores, se realizó un análisis supervisado de los datos de expresión mediante la herramienta POMELO II (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es>) desarrollada por el Grupo de Bioinformática del CNIO [108]. Esta herramienta permite hacer comparaciones por pares de las clases de interés, empleando modelos lineales asociados a los niveles de expresión de los genes y aplicando un test bayesiano para obtener aquellos diferencialmente expresados (t-test *limma* en la aplicación). El valor de significación se estimó atendiendo al *p*-valor, que fue ajustado por *False Discovery Rate* (FDR) usando la corrección de Benjamini [109]. Aquellos genes con un $FDR < 0,05$ ó $FDR < 0,15$, dependiendo de la comparación, fueron seleccionados como diferencialmente expresados de manera significativa entre las clases comparadas.

5.3.6. Análisis Funcional

Para el análisis de enriquecimiento de bloques de genes entre las clases genéticas comparadas se utilizó el método *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA [110]. Este método testa grupos de genes con una anotación funcional común como por ejemplo una misma ruta biológica. Para ello emplea una lista de genes ordenados y determina si los grupos de genes se encuentran sobre-representados en alguna de las clases comparadas. Para ordenar los genes, se realiza un t-test *limma* moderado a las comparaciones y se aplica el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnoff considerando un $FDR \leq 0,25$ como significativo para la identificación de rutas biológicamente relevantes [111]. Para aplicar este método se emplearon tres fuentes de anotación funcional distintas:

Biocarta pathways: conjunto de modelos gráficos dinámicos que muestran como interaccionan las proteínas. Estos mapas se actualizan constantemente de

acuerdo a la nueva información disponible (<http://www.biocarta.com/genes/index.asp>).

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways: colección de mapas de rutas, depuradas manualmente, que representan el conocimiento existente sobre las interacciones moleculares y redes de reacciones entre el metabolismo, el procesamiento de información genética, el procesamiento de información ambiental, los procesos celulares, las enfermedades humanas y el desarrollo de drogas (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Gene Ontology (GO): ontología de términos biológicos diseñada con el fin de estandarizar y sistematizar la nomenclatura de los procesos biológicos, de las funciones moleculares y de la localización subcelular de los productos de los genes conocidos. GO representa el conocimiento biológico como un árbol jerárquico, de manera que, los niveles superiores representan conceptos biológicos más generales y los inferiores los más precisos (<http://geneontology.org>).

5.3.7. Identificación de una firma molecular relacionada con pronóstico mediante la aplicación de un predictor

Un predictor es una herramienta matemática que utiliza diferentes conjuntos de datos (Ej. los transcriptomas) correspondientes a diferentes clases de objetos (Ej. tumores benignos y tumores malignos) para aprender a distinguir entre dichas clases. El aspecto más importante de este proceso de aprendizaje es la evaluación del clasificador generado. Se utilizó el programa *Tnasas*, incluido en el paquete de herramientas *Asterias*, para construir un clasificador de pronóstico clínico a partir de nuestros tumores [112]. *Tnasas* se basa en un esquema de validación cruzada especialmente diseñado para producir errores de validación imparciales. Este programa incorpora diferentes métodos para la selección de genes y para la predicción. En este estudio, se utilizó el algoritmo SVM [113] con el método *Kernel* de función de bases radiales, para generar la regla de clasificación de los tumores, y el F-ratio para seleccionar el mínimo número de genes que mejor clasificaban los casos de acuerdo a la clase a la que debían pertenecer.

El análisis se llevó a cabo a partir de PCCs/PGLs de mal pronóstico o malignos (M) (aquellos procedentes de pacientes con metástasis), y de PCCs/PGLs de buen pronóstico o benignos (B), procedentes de pacientes que no presentaban metástasis en el momento del diagnóstico ni durante un amplio seguimiento (más de ocho años). Los resultados del predictor fueron visualizados con el programa *Java TreeView*

(<http://treeview.sourceforge.net/>), tras realizar un agrupamiento jerárquico no supervisado únicamente con los datos de expresión de los genes que componían la firma molecular de pronóstico. Para ello se empleó el programa *Gene Cluster*, (<http://rana.stanford.edu/software>) utilizándose la distancia euclídea para calcular la distancia entre los genes y la correlación lineal para calcular la distancia entre los distintos tumores. El algoritmo empleado en el *clustering* fue *UPGMA* [114].

5.4. Validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Previamente, se llevó a cabo un protocolo de purificación con ADNasa:

Tratamiento del ARN con ADNasa (*DNA-freeTM kit*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU)

- 1.- Añadir 0,1 volúmenes de 10X *DNase I Buffer* y 1 µl de *rDNase I* al ARN a purificar (hasta un máximo de 10 µg) y mezclar suavemente.
- 2.- Incubar durante 20-30 minutos a 37°C en un termobloque o en un baño de agua.
- 3.- Añadir 2 µl de *DNase Inactivation Reagent*, previamente resuspendido, y mezclar bien.
- 4.- Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente.
- 5.- Centrifugar a 13.000 rpm durante 1,5 minutos y transferir el ARN a un tubo nuevo.

Transcripción reversa

- 1.- Partir de 1 µg de ARNt en 10 µl de volumen final.
- 2.- Preparar una mezcla inicial por muestra conteniendo 1 µl de *Random Hexamers* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU) a una concentración de 500 ng/µl y 1 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM. Añadir esta mezcla a 10 µl de muestra de ARNt.
- 4.- Los siguientes pasos tienen lugar en un termociclador. Calentar a 65°C durante 5 minutos. Quince segundos antes de que termine el paso anterior, detener el termociclador y poner las muestras en hielo hasta que la temperatura del termociclador baje a 25°C.

- 3.- Preparar una segunda mezcla con 2 μ l de *DTT* a una concentración de 0,1 M, 4 μ l de *Buffer 5X*, 1 μ l de enzima *RNase OUT* (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) con una actividad de 40 U/ μ l y 1 μ l de enzima *MLLV* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) con una actividad de 200 U/ μ l.
- 5.- Añadir a cada muestra los 8 μ l de esta segunda mezcla. El volumen final de reacción tiene que ser de 20 μ l. Incubar a 25°C durante 10 minutos.
- 6.- Incubar a 37°C durante 45 minutos.
- 7.- Incubar a 70°C durante 10 minutos y mantener a 4°C si se va a continuar con la RT-qPCR. En caso contrario, conservar el ADNc a -20°C.

RT-qPCR

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo mediante un sistema de detección *ABI Prism 7900HT* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), utilizando *primers* específicamente diseñados para cada gen y sondas pertenecientes a la *Universal Probe Library Set* humana (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, EEUU). Para la reacción de amplificación se utilizó *Universal Master Mix* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- 10 minutos a 95 °C
 - 15 segundos a 95 °C
 - 1 minuto a 65 °C
- } 55 ciclos

La asociación entre el número de sonda de la Librería Roche y los genes anañizados se muestra en la tabla 3MS del material suplementario. Las amplificaciones se realizaron por triplicado y se utilizó el mismo umbral de fluorescencia (0,025) para todos los genes analizados, de manera que todas las reacciones se encontrasen en la fase exponencial de la curva de amplificación. El análisis se llevó a cabo calculando el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar este umbral (C_t) en cada gen y muestra. La normalización posterior de los datos se llevó a cabo utilizando el gen ubicuo *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), previamente descrito como un buen control interno para RT-qPCR en este tipo de tejidos [115]. Para el cálculo de las cantidades relativas de ARNm se empleó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [116] y se aplicó el test de Mann-Whitney para determinar la significación estadística ($p \leq 0,05$) de la diferencia de expresión entre las clases comparadas.

5.5. Estudios de metilación

El análisis de los niveles de hiper-metilación de las islas CpG de la región promotora del gen *Egln3*, se llevó a cabo mediante *Methylation-specific PCR* (MSP) [117]. Para la modificación del ADN con bisulfito se empleó el kit comercial *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research, Orange, CA, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y detallado a continuación:

Se parte inicialmente de 500 ng-2 µg de ADN. Para un resultado óptimo añadir 1 µg de ADN y alcanzar un volumen de 20 µl con agua tratada con DEPC.

- 1.- Añadir 130 µl de *CT Conversion Reagent* a cada muestra de ADN. Mezclar y centrifugar brevemente.
- 2.- Colocar los tubos en un termociclador y aplicar el siguiente programa: 98°C durante 10 minutos; 64°C durante 2,5 horas; 4°C hasta 20 horas
- 3.- Añadir 600 µl de *M-Binding Buffer* a cada columna *Zymo-Spin™ IC* e introducir en un tubo recolector.
- 4.- Depositar la muestra dentro de la columna. Cerrar la tapa y mezclar invirtiendo la columna varias veces.
- 5.- Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el líquido eluido.
- 6.- Añadir 100 µl de *M-Wash Buffer* a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos.
- 7.- Añadir 200 µl de *M-Desulphonation Buffer* a la columna y dejar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Tras la incubación, centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos.
- 8.- Añadir 200 µl de *M-Wash Buffer* a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos. Añadir nuevamente 200 µl de *M-Wash Buffer* y centrifugar a 13.000 rpm durante 30 segundos.
- 9.- Colocar la columna en un tubo de 1,5 ml. Añadir 10 µl de *M-Elution Buffer* directamente sobre la membrana de la columna. Centrifugar durante 30 segundos a 13.000 rpm para eluir el ADN.

El ADN obtenido se puede utilizar inmediatamente o bien puede conservarse a -20 °C hasta su utilización (hasta un máximo de 2 meses).

Amplificación del ADN modificado

Para ello se empleó la enzima *EcoStart* (Ecogen, Barcelona, España). Los *primers* y las condiciones utilizadas se muestran en la Tabla 2. Como control

negativo de los ensayos se emplearon linfocitos normales (NL) y como control positivo de la metilación se utilizó ADN metilado *in vitro* (IVD).

Primers	Secuencia 5'-->3'
MSP-EGLN3-Fm	GTTTTTTGGGATTTTTCGC
MSP-EGLN3-Rm	ACTACGACCAAACCTCCGAAA
MSP-EGLN3-Fu	GGGTTTTTTGGGATTTTGT
MSP-EGLN3-Ru	CAACTACAACCAAACCTCCAAA

Tabla 2. Secuencia de los *primers* empleados para la amplificación del ADN modificado. Fm y Rm, *primers* directo y reverso para la secuencia metilada respectivamente; Fu y Ru, *primers* directo y reverso para la secuencia no metilada.

5.6. Inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico de la proteína EglN3 fue realizado en el servicio de Inmunohistoquímica del CNIO, utilizando para ello el anticuerpo monoclonal de ratón P3-188e facilitado por el grupo del Dr. Harris [118, 119]. La detección del antígeno se llevó a cabo sobre cortes procedentes de los TMAs descritos previamente. La valoración de los cristales fue realizada por un patólogo que llevó a cabo una evaluación aplicando el sistema de cuatro categorías (de 0 a 3+) propuesto por DAKO (DAKO Diagnósticos SA, Madrid, España) para la evaluación del *HercepTest* [120].

RESULTADOS

RESULTADOS BLOQUE I

*Caracterización molecular de pacientes con
PCCs/PGLs en población española*

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PACIENTES: ASOCIACIÓN ENTRE EL GENOTIPO Y EL FENOTIPO

El estudio de caracterización genética se llevó a cabo en un total de 256 pacientes, aparentemente no relacionados, diagnosticados con PCC/PGL. Inicialmente, se encontró una mutación germinal en alguno de los principales genes de susceptibilidad (*RET*, *VHL*, *SDHs*) en 100 pacientes (39%). La distribución de las mutaciones atendiendo al gen implicado fue la siguiente: 37 mutaciones en *RET*, 21 en *VHL*, 29 en *SDHB*, 12 en *SDHD* y 1 en *SDHC*. Posteriormente se encontraron dos mutaciones en los nuevos genes de susceptibilidad: 1 en *SDH5* y 1 en *TMEM127*, que elevó el porcentaje de detección de mutación germinal a un 39,8% de los pacientes.

La presencia de un antecedente sindrómico (MTC, hemangioblastomas, etc) en un paciente con PCC/PGL, tanto familiar como personal, indica claramente cuál puede ser el gen implicado. Por lo tanto, y con el objeto de mejorar el diagnóstico molecular y el consejo genético ofrecido sobre todo a los pacientes sin antecedentes sindrómicos, se decidió establecer dos grupos en nuestra serie atendiendo a si presentaban o no antecedentes de alguno de los principales síndromes tumorales hereditarios: MEN2 y VHL.

1.1. Pacientes sindrómicos

Un 17,5% de los probandos (45/256) tenía antecedentes de MEN2 o VHL. El 100% de estos pacientes sindrómicos presentó una mutación germinal en alguno de los dos genes implicados: *RET* y *VHL* respectivamente (Tabla 3). En todos los casos la localización del tumor fue adrenal y ninguno de los pacientes presentó metástasis procedente del PCC.

Gen- ID Paciente	Edad de diagnóstico	Tumor	PCC primero	Otros tumores	Mutación		Historia Familiar
					ADNc	Proteína	
VHL-132	34	PCC (B)	No	TP	c.340G>A	p.Gly114Ser	No
VHL-200	27	PCC	No	CRCC	c.388G>C	p.Val130Leu	Si
VHL-71	13	PCC	No	Hblc, Ar	c.482G>A	p.Arg161Gln	No
VHL-61	28	PCC	No	Ar	c.485G>A	p.Cys162Tyr	Si
VHL-40	42	PCC (B)	No	CRCC, Ar	c.499C>T	p.Arg167Trp	Si
VHL-64	14	PCC (B)	Si	Qr, TP	c.499C>T	p.Arg167Gln	No
VHL-133	28	PCC (B)	Si	Ar	c.500G>A	p.Arg167Gln	No
VHL-168	23	PCC (B)	Si	Hblc, Hblm, CRCC, TP	c.500G>A	p.Arg167Gln	No
VHL-206	47	PCC	Si	-	c.500G>A	p.Arg167Gln	Si
VHL-11	32	PCC (B)	No	Ar	c.523T>A	p.Tyr175Asn	No
RET-2	58	PCC	Si	MTC	c.1832G>T	p.Cys611Phe	Si
RET-263	48	PCC	Si	MTC	c.1852T>C	p.Cys618Arg	Si
RET-107	32	PCC	Si	MTC	c.1853G>T	p.Cys618Phe	Si
RET-229	34	PCC	No	MTC	c.1853G>T	p.Cys618Phe	Si
RET-170	31	PCC (B)	No	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	Si
RET-187	24	PCC (B)	Simultaneamente	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	Si
RET-227	42	PCC (B)	Si	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	Si
RET-313	36	PCC (B)	Simultaneamente	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	Si
RET-356	19	PCC (B)	No	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	Si
RET-462	37	PCC (B)	Si	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	No
RET-468	33	PCC	Simultaneamente	MTC	c.1900T>C	p.Cys634Arg	Si
RET-63	28,30	PCC (B)	No	MTC	c.1900T>G	p.Cys634Gly	Si
RET-4	40	PCC	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-10	22	PCC	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-13	42	PCC (B)	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-27	52	PCC (B)	Si	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	No
RET-46	44	PCC (B)	Si	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	No
RET-47	49	PCC (B)	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	No
RET-95	27	PCC	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-101	50	PCC (B)	Si	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-102	45	PCC	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-127	52	PCC (B)	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-258	45	PCC (B)	Si	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-293	36	PCC	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-304	47	PCC (B)	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	No
RET-375	41	PCC	Simultaneamente	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-386	46	PCC (B)	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-392	39	PCC (B)	No	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-458	37	PCC (B)	Si	MTC	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	No
RET-128	52	PCC	No	MTC	c.1901G>C	p.Cys634Ser	No
RET-1	21	PCC	No	MTC	c.1902C>G	p.Cys634Trp	Si
RET-40	49	PCC (B)	No	MTC	c.1902C>G	p.Cys634Trp	Si
RET-90	34	PCC (B)	Si	MTC	c.2753T>C	p.Met918Thr	No
RET-204	22	PCC (B)	Simultaneamente	MTC, Nm	c.2753T>C	p.Met918Thr	Si
RET-400	30	PCC (B)	Simultaneamente	MTC, Nm	c.2753T>C	p.Met918Thr	No

Tabla 3. Características clínicas y genéticas de los casos sindrómicos. B: bilateral; TP: tumor pancreático; CRCC: carcinoma renal de células claras; Hblc: hemangioblastoma cerebeloso; Ar: angioma retiniano; Qr: quistes renales. Hblm: hemangioblastoma medular; MTC: carcinoma medular de tiroides.

El 78% de los pacientes (35/45), con edades de diagnóstico comprendidas entre los 19 y los 58 años (38,5 años de media), mostró una mutación que afectaba al gen *RET* (Figura 7). Un 63% de estos pacientes (22/35) presentó PCC bilateral y el 48,5% (17/35) manifestaron el PCC antes o simultáneamente al diagnóstico de MTC (Tabla 3). El restante 22% de los casos (10/45) presentó una mutación en el gen *VHL*. Estos pacientes fueron diagnosticados entre los 13 y los 47 años de edad (media de 28,8 años), y manifestaron un PCC bilateral en un 60% (6/10) de los casos, siendo el PCC la primera manifestación clínica del síndrome en un 40% (4/10) del total de pacientes *VHL*.

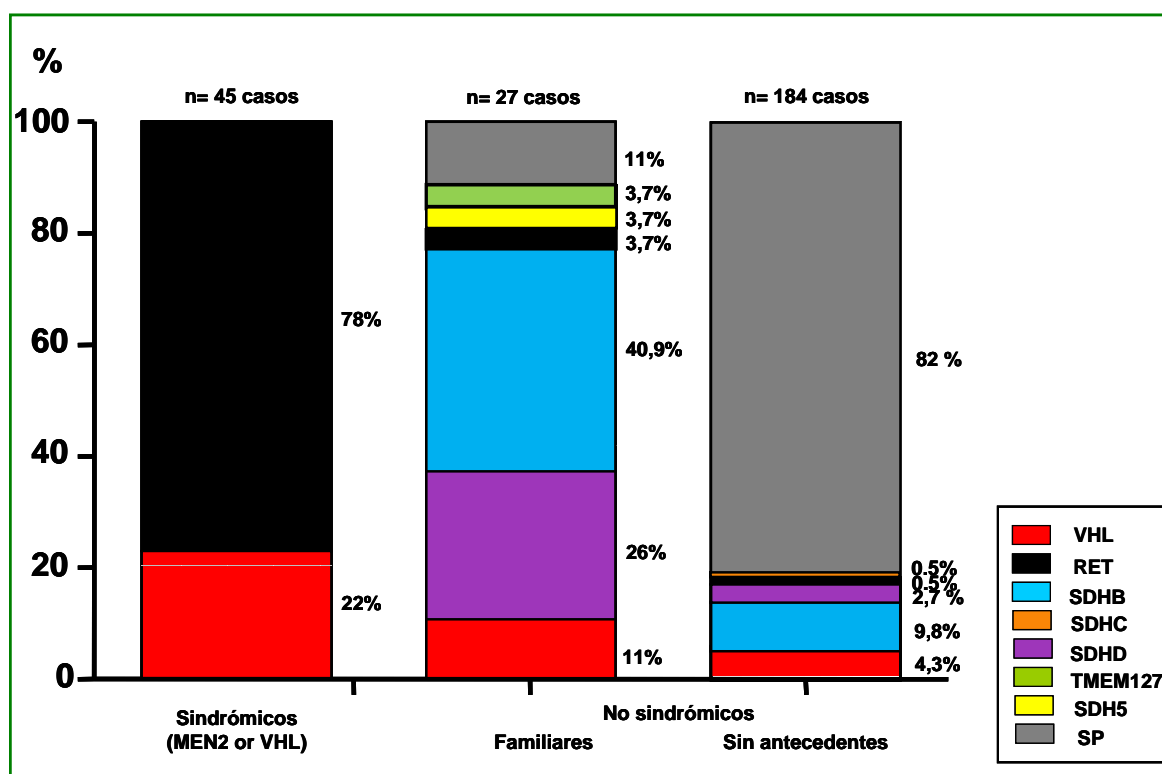


Figura 7. Distribución de los 256 casos de nuestra serie dependiendo de: gen mutado, antecedentes sindrómicos y antecedentes familiares.

1.2. Pacientes no sindrómicos

Un 82,4% de los pacientes recogidos en este trabajo (211/256) no manifestó la enfermedad en el seno de los síndromes MEN2 y *VHL*. Sin embargo, un porcentaje de estos casos presentaba antecedentes familiares de PCC/PGL, y se decidió nuevamente establecer dos grupos de pacientes atendiendo a este criterio.

1.2.1. Casos con antecedentes familiares de PCC/PGL

Un 12,8% de los probandos no sindrómicos (27/211) presentaron antecedentes familiares de PCC/PGL. Inicialmente, se detectó una mutación germinal en el 81,5% de ellos (22/27): 11 en el gen *SDHB*, 7 en *SDHD*, 3 en *VHL* y 1 en *RET* (Tabla 4). Los restantes 5 casos familiares resultaron negativos en la búsqueda de mutaciones en los genes *RET*, *VHL* y *SDHs*.

El posterior estudio de los dos nuevos genes de susceptibilidad hereditaria a desarrollar PCC/PGL (*TMEM127* y *SDH5*) permitió detectar un caso positivo para cada gen. Los árboles genealógicos de ambas familias se muestran en la Figura 8. El porcentaje definitivo de casos familiares no sindrómicos con mutación fue del 88,9% (24/27). Entre los 3 casos sin mutación, 2 de ellos presentaban PCC benigno (uno de ellos bilateral) y sus antecedentes familiares consistían también en tumores adrenales. El tercer caso desarrolló un único tumor yugular y su primo paterno tenía un PGL abdominal.

Aunque el 87,2% (184/211) de los casos no sindrómicos carecía de antecedentes familiares de la enfermedad (Figura 7), se encontraron mutaciones germinales en el 17,8% (33/184) de ellos: 18 en *SDHB*, 8 en *VHL*, 5 en *SDHD*, 1 en *RET* y 1 en *SDHC*. Con respecto a las manifestaciones clínicas más relevantes, cabe destacar que el 58,8% (10/17) de los casos con tumores múltiples en diferentes órganos presentaba mutación y que el 31,5% (6/19) y el 60% (3/5) de los casos con PCC bilateral o con PGL bilateral carotídeo, respectivamente, resultó también positivo. Finalmente, un 64,2% (9/14) casos con metástasis presentó una mutación germinal, principalmente en *SDHB* (Tabla 4).

Gen-ID Paciente	Edad de diagnóstico	Localización de la metástasis	Tumor	Mutación ADNc	Proteína	Historia familiar
RET-84	50, 54	-	PCC, Ab	c.1901G>A	p.Cys634Tyr	Si
RET-210v	74	-	PCC	c.2410G>T	p.Val804Leu	-
SDH5-94	23	-	Ct (B), Y, V	c.232G>A	p.Gly78Arg	Si
SDHB-129†	17, 21, 26	Hueso	PCC, Ab, T, Ct ^m	c.1-10413_73-3866del	p.?	-
SDHB-133	14	-	T	c.1-10413_73-3866del	p.?	-
SDHB-156†	19	Hueso, hígado, mesenterio	Ab ^m	c.1-10413_73-3866del	p.?	-
SDHB-22†	30	-	Ab	c.1-10413_73-3866del	p.?	-
SDHB-31†	14	-	Ab	c.1-10413_73-3866del	p.?	Si
SDHB-179	24	Mediastino	PCC ^m	c.1-10413_73-3866del	p.?	Si
SDHB-146	42	Hueso	Ab ^m	c.1-10413_73-3866del	p.?	-
SDHB-38†	26	-	Ct	Exon 1-8 deletion	p.?	-
SDHB-224v	14	-	PCC	c.49A>G		Si
SDHB-30†	32, 32, 34	-	PCC, T, Ct	c.79C>T	p.Arg27X	Si
SDHB-140	39	Hígado	Ab ^m	c.79C>T	p.Arg27X	Si
SDHB-96	12	-	Ab	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	-
SDHB-46†	13, 13	Hígado	T, Ab ^m	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	-
SDHB-77†	14	-	Ab	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	-
SDHB-107	39, 39	-	Ab, T	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	-
SDHB-114	27	Ganglios	Ct (B) ^m	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	-
SDHB-124	32	-	T	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	-
SDHB-163	12, 36	-	PCC, Ct, L	c.166_170delCCTCA	p.Pro56delTyrfsX5	Si
SDHB-39	38	Pulmón	T ^m	c.278G>A*	p.Cys93Tyr	-
SDHB-127	36, 36, 36	-	Ct (B), Ab, T	c.423+1G>A	p.?	-
SDHB-135	40	-	Ab	c.424-3C>G	p.?	-
SDHB-ext	65	Hueso	Ab ^m	c.424-3C>G	p.?	Si
SDHB-34	55	Mediastino	Ab ^m	c.583_585delAGC	p.Ser195del	-
SDHB-128	21	-	Ab	c.643-2A>C*	p.?	-
SDHB-60†	12	-	T	c.644delC	p.Tyr216IlefsX4	Si
SDHB-75	22	-	Ab	c.689G>A	p.Arg230His	Si
SDHB-124v	47, 51	Hueso	Ct, Ab ^m	c.689G>A	p.Arg230His	Si
SDHB-95	65	-	PCC	c.725G>A	p.Arg242His	-
SDHB-99	38	-	Ct	c.780delG*	p.Ala262LeufsX8	Si
SDHC-141m†	60	-	Ct	c.253_255dupTTT	p.Phe85dup	-
SDHD-141	38	-	V	c.2T>C	p.Met1?	-
SDHD-121	42, 46	-	PCC, Ct	c.3G>A*	p.Met1?	Si
SDHD-68	22	-	Ct (B), Y	c.14G>A	p.Trp5X	Si
SDHD-61	18	-	Ct (B)	c.64C>T	p.Arg22X	Si
SDHD-50†	31, 35	Pelvis y perineo	Ab, Ct, T ^m	c.129G>A	p.Trp43X	Si
SDHD-111	14, 24	Pulmón	Ct (B) ^m	c.129G>A	p.Trp43X	Si
SDHD-119	40	-	Ct	c.168_169delTT	p.Ser57TrpfsX11	-
SDHD-52	29, 38, 55	-	Ct, PCC	c.191_192delTC	p.Leu64ProfsX4	Si
SDHD-123	23	Mediastino, pelvis y perineo	Ab ^m	c.210G>T*	p.Arg70Ser	-
SDHD-85	11	-	Ct, Y	c.302T>C*	p.Leu101Pro	Si
SDHD-78	27	-	Ct (B), Y	c.317delG*	p.Gly106AlafsX29	-
SDHD-5†	17, 20, 20, 29	-	Ct (B), PCC (B), Ab	c.334_337delACTG	p.Asp113MetfsX21	-
TMEM127-106	38	-	PCC	c.409+1G>T	p.?	Si
VHL-158	52	-	PCC (B)	c.188T>A*	p.Leu63Gln	-
VHL-96	44	-	PCC (B)	c.250G>A*	p.Val84Met	-
VHL-70	15, 17	-	PCC (B), Ab	c.284C>G	p.Pro95Arg	-
VHL-90	22	-	PCC (B)	c.320G>A	p.Arg107His	-
VHL-125	23, 23	-	PCC (B), Ct	c.355T>C*	p.Phe119Leu	-
VHL-69	30	-	PCC (B)	c.482G>A	p.Arg161Gln	Si
VHL-110	16	-	PCC, T	c.482G>A	p.Arg161Gln	-
VHL-212	18	-	PCC	c.482G>A	p.Arg161Gln	-
VHL-169	10, 17	Pulmón	PCC (B) ^m	c.499C>T	p.Arg167Trp	-
VHL-159	15	-	PCC (B)	c.500G>A	p.Arg167Gln	Si
VHL-15	37	-	PCC	c.524A>G	p.Tyr175Cys	Si

*, Mutaciones no publicadas previamente; †, casos publicados; B, bilateral; Ct, PGL carotideo; V, PGL vaginal; Ab, PGL abdominal; T, PGL torácico; Y, PGL yugulo timpánico; L, PGL de lengua; ^m, metástasis

Tabla 4. Características clínicas y genéticas de los casos no-sindrómicos con mutación

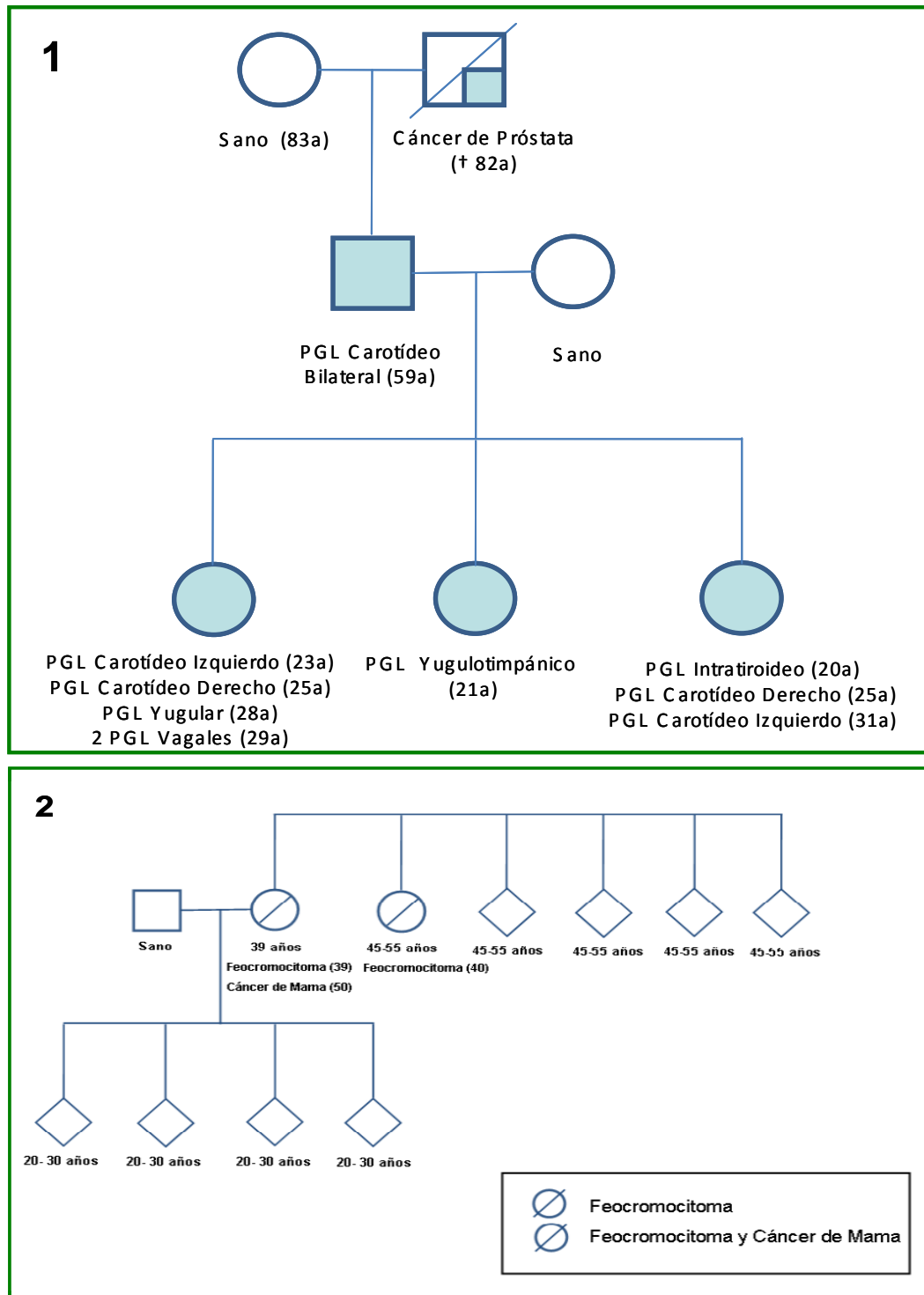


Figura 8. Árboles genealógicos de las familias con mutación en los nuevos genes de susceptibilidad: 1) *SDH5*; 2) *TMEM127*

1.2.2. Casos “aparentemente esporádicos”

Dado que la presencia de antecedentes familiares o la aparición de varios tumores se asociaba claramente con la presencia de una mutación germinal ($p < 0,001$), nos interesó saber qué ocurría con los casos “aparentemente esporádicos”, definidos aquí

como aquellos pacientes que desarrollan un único tumor y no tienen antecedentes familiares o personales de ninguna enfermedad relacionada. En este caso, el 12,4% (18/145) de los pacientes con edades de diagnóstico comprendidas entre los 12-67 años (con una media de 35,8 años) portaron una mutación germinal: 12 en el gen *SDHB*, 3 en *SDHD*, 1 en *VHL*, 1 en *SDHC* y 1 en *RET*. El restante 87,6% de los casos (127/145), de entre 6 y 80 años (47,2 años de media) no presentaron ninguna alteración germinal.

En cuanto a la localización tumoral de los casos “aparentemente esporádicos”, el 3,9% (4/103) de los casos que presentaban un único tumor adrenal (PCC) portaban una mutación: 2 en *SDHB*, 1 en *VHL* y 1 en *RET*. Por otro lado, el 22,2% de los casos (4/18) con un PGL de cabeza y cuello como única manifestación presentaban mutación en alguno de los genes *SDH*: 2 en *SDHD*, 1 en *SDHB* y 1 en *SDHC*. Finalmente, el 41,7% (10/24) de los pacientes con un PGL en localización torácica o abdominal/retroperitoneal mostraron una mutación en los genes *SDH*: 9 en *SDHB* y 1 en *SDHD*.

1.3. Estudio de haplotipos

El análisis de haplotipos reveló que todos los portadores (n=9) de la mutación c.166_170delCCTCA de *SDHB* compartían un mismo haplotipo raro (frecuencia de 1,05%). Con respecto a la delección del exón 1 de *SDHB*, c.1-10413_73-3866del, encontrada en 7 pacientes independientes, se pudo confirmar que todos los portadores analizados (n=24) compartían un mismo haplotipo, siendo éste el más frecuente dentro de nuestra población (frecuencia de 30%)(Tabla 4).

Con respecto a las mutaciones de *SDHD*, todos los portadores de la variante c.129G>A (n=12) compartían un mismo haplotipo infrecuente (0-0,73%). Lo mismo ocurrió para la segunda mutación, c.334_337delACTG, la cual fue encontrada en un mismo haplotipo (frecuencia de 0,47-4,95%) en todos los portadores estudiados (n=9).

Gen	Mutación	Casos independientes (portadores)	Haplotipo	Frecuencia en la población española [†]
<i>SDHB</i>	c.166_170delCCTCA	7 (n=9)	D1S2697: 267 rs2235930: T rs7550829: C rs2746467: C rs10887990: T rs4920653: C	1,05%
<i>SDHB</i>	c.1-10413_73-3866del	7 (n=24)	GATA29A05: 202 D1S2697: 267 rs2235930: C rs7550829: C rs2746467: C rs10887990: C rs4920653: T	30%
<i>SDHD</i>	c.129G>A	8 (n=12)	GATA29A05: 202 D11S1793: 130 D11S4078: 157 D11S1987: 197 D11S1786: 252 D11S1885: 253	0 – 0,73%
<i>SDHD</i>	c.334_337delACTG	4 (n=9)	D11S4078: 155 D11S1987: 201 D11S1786: 254 D11S1885: 253	0,47 – 4,95%

†, nivel de confianza del 95%

Tabla 5. Resultado del estudio de haplotipos en las cuatro mutaciones estudiadas.

RESULTADOS BLOQUE II

*Caracterización mediante perfiles
transcripcionales de la serie de PCCs/PGLs*

2. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS TUMORES

2.1. Caracterización genética de los tumores

El estudio de mutaciones en los 5 genes de susceptibilidad realizado en nuestra serie de 84 PCCs/PGLs reveló variantes patogénicas en 43 de ellos: 15 fueron positivos para mutaciones en el gen *RET*, 15 en *VHL*, 8 en *SDHB*, 4 en *SDHD* y 1 en *SDHC* (Tabla). Se disponía además de 4 tumores de pacientes con manifestaciones clínicas (o antecedentes) de NF1. Del resto de tumores, 6 pertenecían a pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad (PCC) y se clasificaron como casos familiares sin mutación (FPCC). Finalmente, 31 tumores negativos para el estudio y sin antecedentes fueron clasificados como casos esporádicos (SP) (Tabla 3MS de material suplementario).

En los tumores FPCC, se analizó el gen *TMEM127* dada su reciente implicación en casos de PCC familiar (comunicación personal de la Dra. Patricia Dahia). Dos de los tumores presentaron una mutación en este nuevo gen, por lo que finalmente sólo 4 casos fueron considerados como FPCC no asociados a la mutación de ninguno de los genes conocidos hasta la fecha.

2.2. Agrupamiento de los tumores según su perfil global de expresión

El agrupamiento no supervisado de todos los tumores de nuestra serie dio como resultado la distribución de los mismos en dos grupos (*clusters*) claramente diferenciados (Figura 9).

El primer grupo estaba constituido principalmente por los tumores con mutación en *VHL* y los que presentaban mutación en los genes *SDH* (*B*, *C* y *D*), y lo denominamos *cluster* *VHL/SDH*. El segundo grupo estaba representado por los tumores con mutaciones en *RET*, *NF1*, *TMEM127* y por los tumores FPCC, por lo que fue denominado *cluster* *RET/NF1*. En cuanto a los tumores SP, los originados en la región de la cabeza y el cuello se agruparon con los casos *VHL/SDH*, mientras que el resto se distribuyeron principalmente entre los tumores pertenecientes al *cluster* *RET/NF1* (Figura 9).

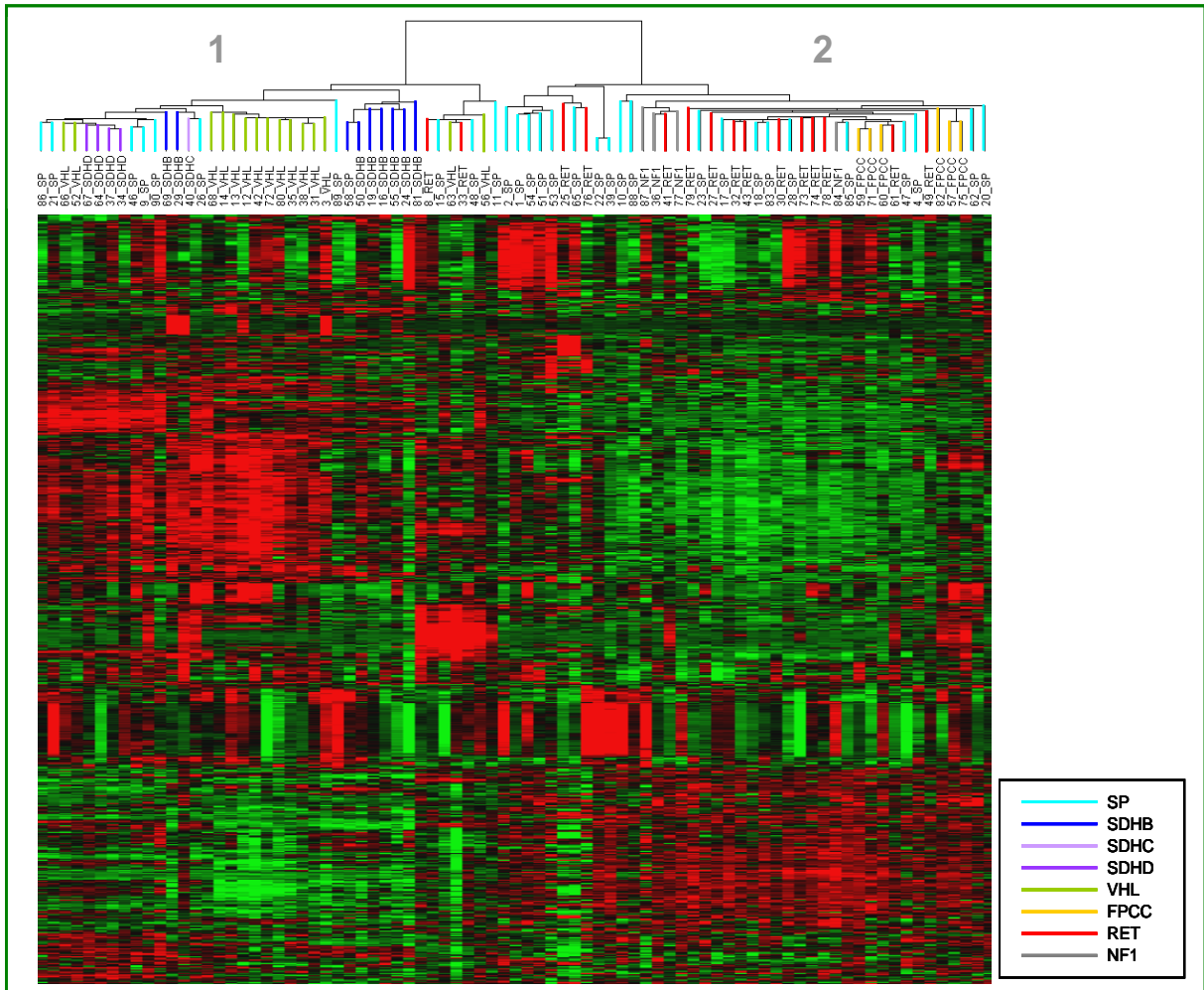


Figura 9. Representación del agrupamiento no supervisado de todos los casos analizados en dos clusters principales: 1) Cluster compuesto principalmente por casos VHL/SDHB. 2) Cluster compuesto principalmente por casos RET/NF.

El *consensus clustering* realizado a continuación confirmó la robustez del agrupamiento no supervisado (Figura 10).

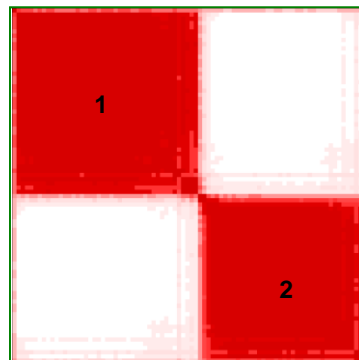


Figura 10. Representación gráfica del *consensus clustering*.

2.3. Diferencias transcripcionales entre los clusters VHL/SDH y RET/NF1

Para encontrar las diferencias existentes entre los dos *clusters* obtenidos en el agrupamiento no supervisado, se llevó a cabo un estudio supervisado considerando únicamente las clases genéticas más representativas dentro de cada uno de ellos: VHL/SDH y RET/NF1. Mediante este estudio, se obtuvo una lista de 993 genes (correspondientes a 1118 clones incluidos en el *array*) diferencialmente expresados ($FDR < 0,05$). Los 50 clones con una mayor significación estadística se muestran en la Figura 11.

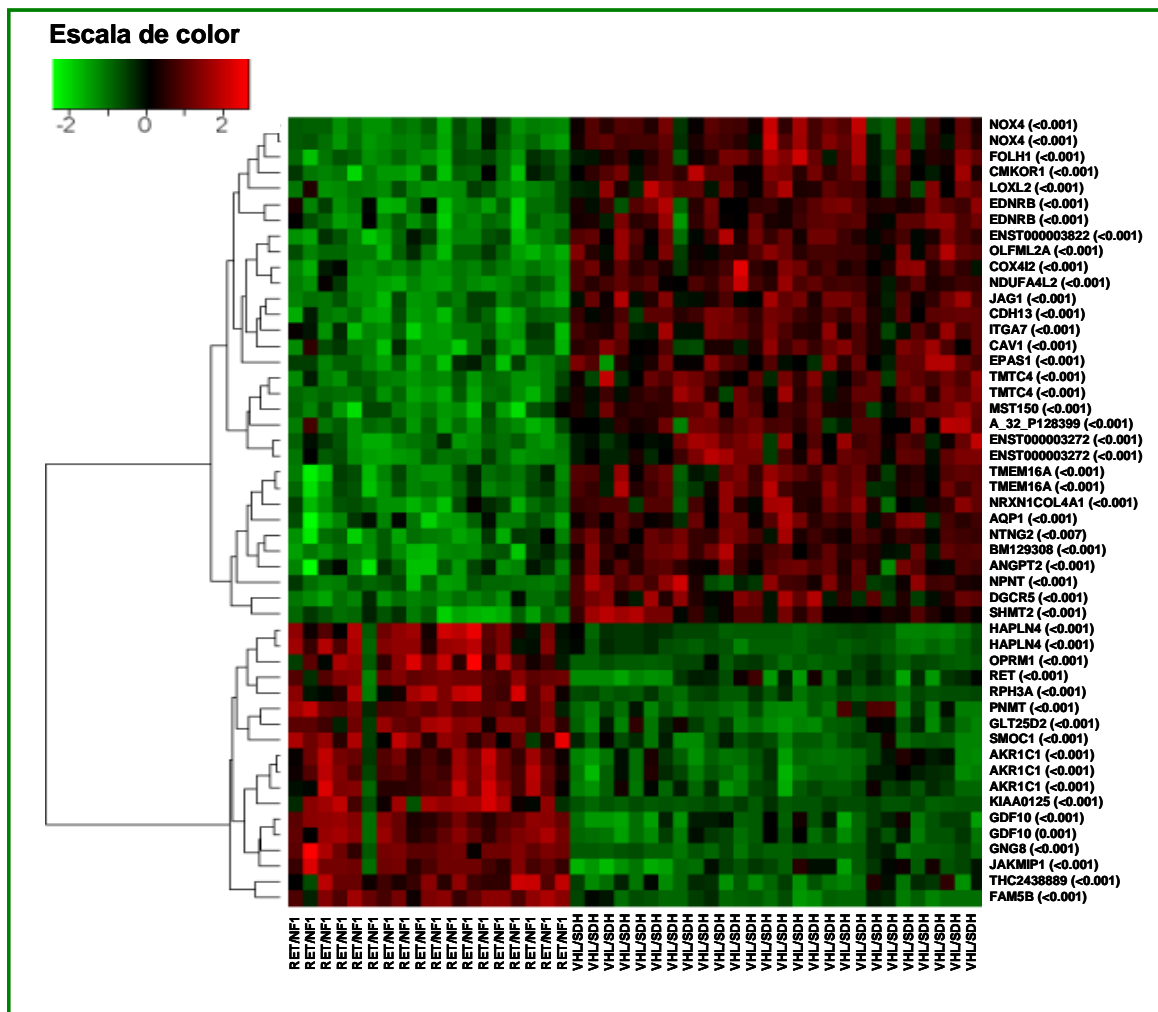


Figura 11. Representación de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística en la comparación entre los casos VHL/SDH y RET/NF1. Figura extraída del programa Pomelo II.

El resultado del análisis de las rutas biológicas diferencialmente enriquecidas en ambos grupos, mediante la herramienta GSEA, se detalla en la Tabla 6. Entre las rutas de *Biocarta*, cabe destacar que el *cluster* VHL/SDH presentaba enriquecidas dos de las rutas principales de hipoxia (HIF y VEGF), así como dos rutas de desarrollo

neuronal relacionadas con NOTCH: NOTCH y PS1. Entre las rutas de *KEGG*, la ruta neuronal de NOTCH de nuevo presentaba un enriquecimiento en los tumores VHL/SDH, así como varias rutas implicadas en procesos de adhesión celular. Por su parte, los tumores RET/NF1 presentaban un enriquecimiento de las rutas de *Biocarta* CK1 y TPO, así como de varias rutas *KEGG* de biosíntesis, entre ellas la ruta de síntesis de esteroides (catecolaminas).

BIOCARTA	NES	NOM p-val
VEGFPATHWAY	1,470	0,042
CARDIACEGFPATHWAY	1,520	0,046
SPPAPATHWAY	1,550	0,044
NO1PATHWAY	1,570	0,021
HIFPATHWAY	1,620	0,032
NOTCHPATHWAY	1,710	0,006
PS1PATHWAY	1,720	0,012
CK1PATHWAY	-1,509	0,043
TPOPATHWAY	-14,999	0,046
KEGG	NES	NOM p-val
NOTCH SIGNALING PATHWAY	0,002	0,020
CALCIUM SIGNALING PATHWAY	0,004	0,440
ECM-RECEPTOR INTERACTION	0,005	0,020
FOCAL ADHESION	0,150	0,080
METHANE METABOLISM	0,260	0,470
MELANOGENESIS	0,290	0,420
BASAL CELL CARCINOMA	0,044	0,430
MELANOMA	0,045	0,530
BENZOATE_DEGRADATION_VIA_COA_LIGATION	-1,689	0,019
FOLATE BIOSYNTHESIS	-1,652	0,023
FATTY_ACID_METABOLISM	-1,672	0,025
BIOSYNTHESIS_OF_STEROIDS	-1,700	0,033
POLYUNSATURATED_FATTY_ACID_BIOSYNTHESIS	-1,667	0,033
CITRATE_CYCLE_(TCA_CYCLE)	-1,665	0,037
BUTANOATE_METABOLISM	-1,579	0,042

Tabla 6. Tabla de resultados significativos extraídos de la comparación VHL/SDH vs RET/NF1 obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES muestra las rutas sobrerrepresentadas en VHL/SDH y el signo negativo, las sobrerrepresentadas en RET/NF1.

2.4. Perfil transcripcional de acuerdo a la expresión de genes “diana” de HIF

Ya que los genes incluidos en las principales rutas relacionadas con hipoxia estaban sobre-representados en el *cluster* SDH/VHL, se llevó a cabo un segundo estudio no supervisado de todos los tumores utilizando para ello una lista de genes relacionados con HIF. El resultado del agrupamiento obtenido utilizando esta lista de genes se muestra en la Figura 12. De nuevo los tumores se distribuyeron en dos *clusters* principales representados por los tumores SDH/VHL y los tumores RET/NF1.

Únicamente dos muestras (un tumor VHL y uno RET) fueron clasificadas erróneamente.

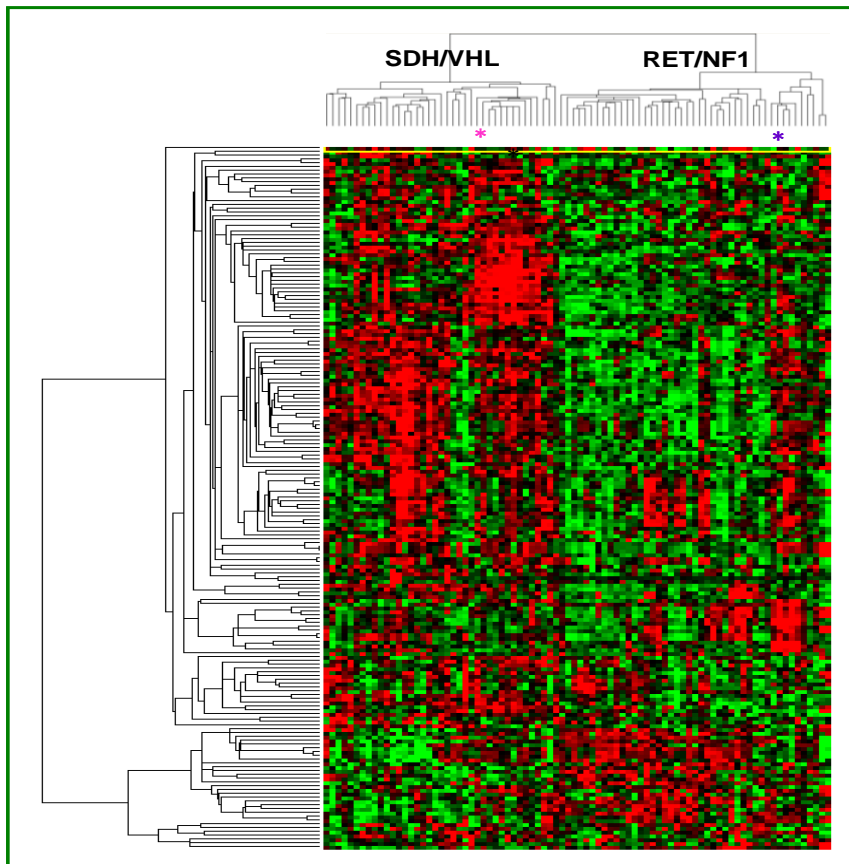
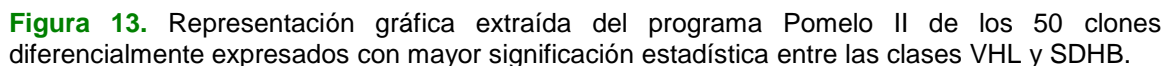


Figura 12. Representación del agrupamiento no supervisado de todos los tumores empleando genes “diana” de *HIF*. *: Casos clasificados incorrectamente.

2.5. Diferencias entre los tumores VHL y los SDHB

Teniendo en cuenta las claras diferencias clínicas y pronósticas existentes entre los tumores VHL y los SDHB, resultaba especialmente llamativo que ambas clases estuvieran agrupadas en un mismo *cluster*. Para encontrar diferencias entre estas dos clases genéticas transcripcionalmente relacionadas, se llevó a cabo una comparación supervisada que permitió identificar una lista de hasta 782 genes diferencialmente expresados ($FDR < 0,05$). Los 50 clones con una mayor significación estadística se muestran en la Figura 13.



118

BIOCARTA	NES	NOM p-val
TNFR1PATHWAY	1,772	0,002
ETSPATHWAY	1,732	0,004
MTA3PATHWAY	1,745	0,004
KERATINOCYTEPATHWAY	1,536	0,005
HIVNEFPATHWAY	1,544	0,010
DEATHPATHWAY	1,581	0,016
SODDPATHWAY	1,627	0,018
D4GDIPATHWAY	1,652	0,019
CLASSICPATHWAY	1,604	0,021
STRESSPATHWAY	1,592	0,022
TNFR2PATHWAY	1,558	0,026
41BBPATHWAY	1,500	0,031
P27PATHWAY	1,494	0,040
EPHA4PATHWAY	-1,629	0,008
INTEGRINPATHWAY	-1,487	0,031
AT1RPATHWAY	-1,416	0,046
CDC42RACPATHWAY	-1,499	0,048
KEGG	NES	NOM p-val
REGULATION_OF_ACTIN_CYTOESKELETON	1,365	0,005
BASAL_CELL_CARCINOMA	1,576	0,005
APOPTOSIS	1,385	0,014
ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	1,474	0,025
HUNTINTON'S_DISEASE	1,529	0,027
B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1,352	0,029
COLORECTAL_CANCER	1,448	0,030
CAPROLACTAM_DEGRADATION	1,528	0,032
RIBOSOME	1,320	0,037
FATTY_ACID_METABOLISM	1,448	0,047
REGULATION_OF_AUTOPHAGY	-1,619	0,022
ALANINE_AND_ASPARTATE_METABOLISM	-1,507	0,038
PYRIMIDINE_METABOLISM	-1,330	0,041
GLYOXILATE_AND_DICARBOXYLATE_METABOLISM	-1,533	0,044
N-GLYCAN_DEGRADATION	-1,573	0,046

Tabla 7. Tabla de resultados significativos de la comparación VHL *versus* SDHB obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES muestra las rutas sobrerrepresentadas en VHL y con signo negativo, las sobrerrepresentadas en SDHB.

2.6. Diferente expresión de los genes diana de HIF en los tumores VHL y SDHB

La misma lista de 558 genes “HIF-dependientes” empleados en el análisis no supervisado de todos los tumores, se utilizó de nuevo para hacer un agrupamiento no supervisado de los tumores con mutación en SDHB o en VHL. Después de descartar aquellos genes que mostraban un patrón plano de expresión en todas las muestras ($SD < 0,8$), quedaron 67 genes para hacer el análisis. El resultado (Figura 14) mostró dos grupos de tumores, VHL y SDHB, claramente diferenciados.

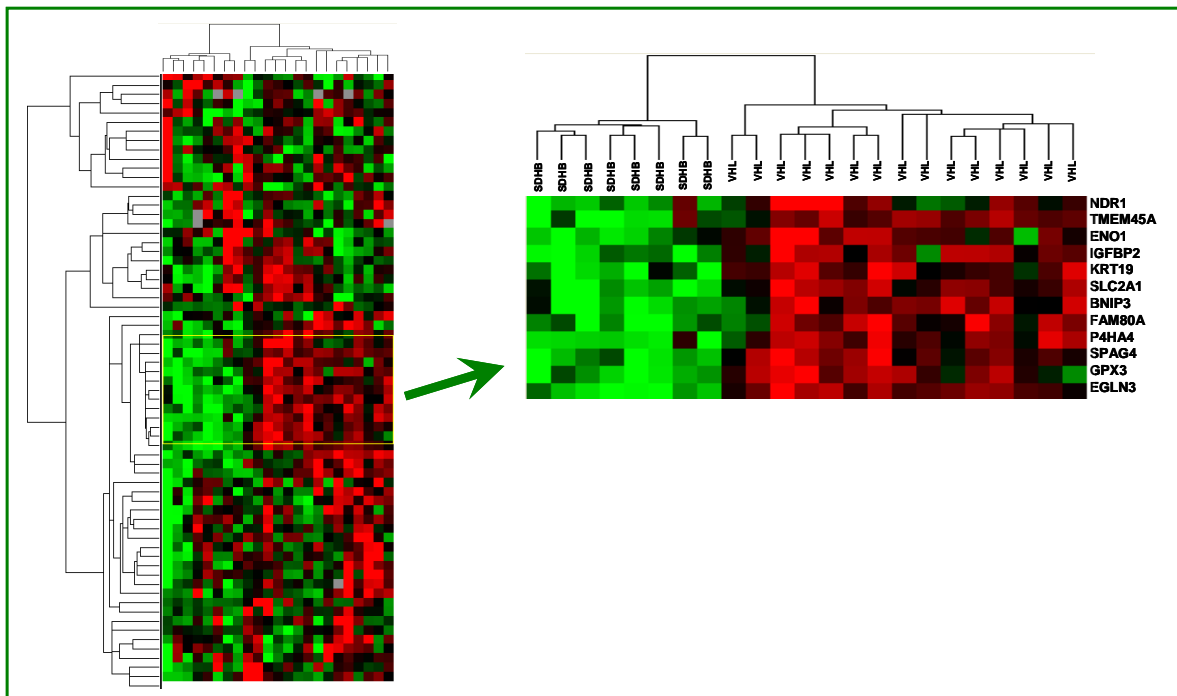


Figura 14. Representación del agrupamiento no supervisado de los casos VHL y SDHB empleando los genes “diana” de HIF. La flecha indica los 12 genes que mejor diferencian ambas clases.

2.7. Diferencias transcripcionales entre los tumores con distintas mutaciones en los genes SDH

Dado que los tumores con mutaciones en *SDHB* presentan un riesgo elevado de malignidad que no se ha visto en tumores con mutaciones en los otros dos genes SDH asociados con el desarrollo de PCC, decidimos estudiar las diferencias a nivel transcripcional entre ambos grupos. El análisis supervisado de los 8 casos SDHB frente a los 5 SDHC-D mostró un total de 300 genes (332 clones) diferencialmente expresados ($FDR < 0,05$). Los 50 clones con una mayor significación estadística se muestran en la Figura 15.

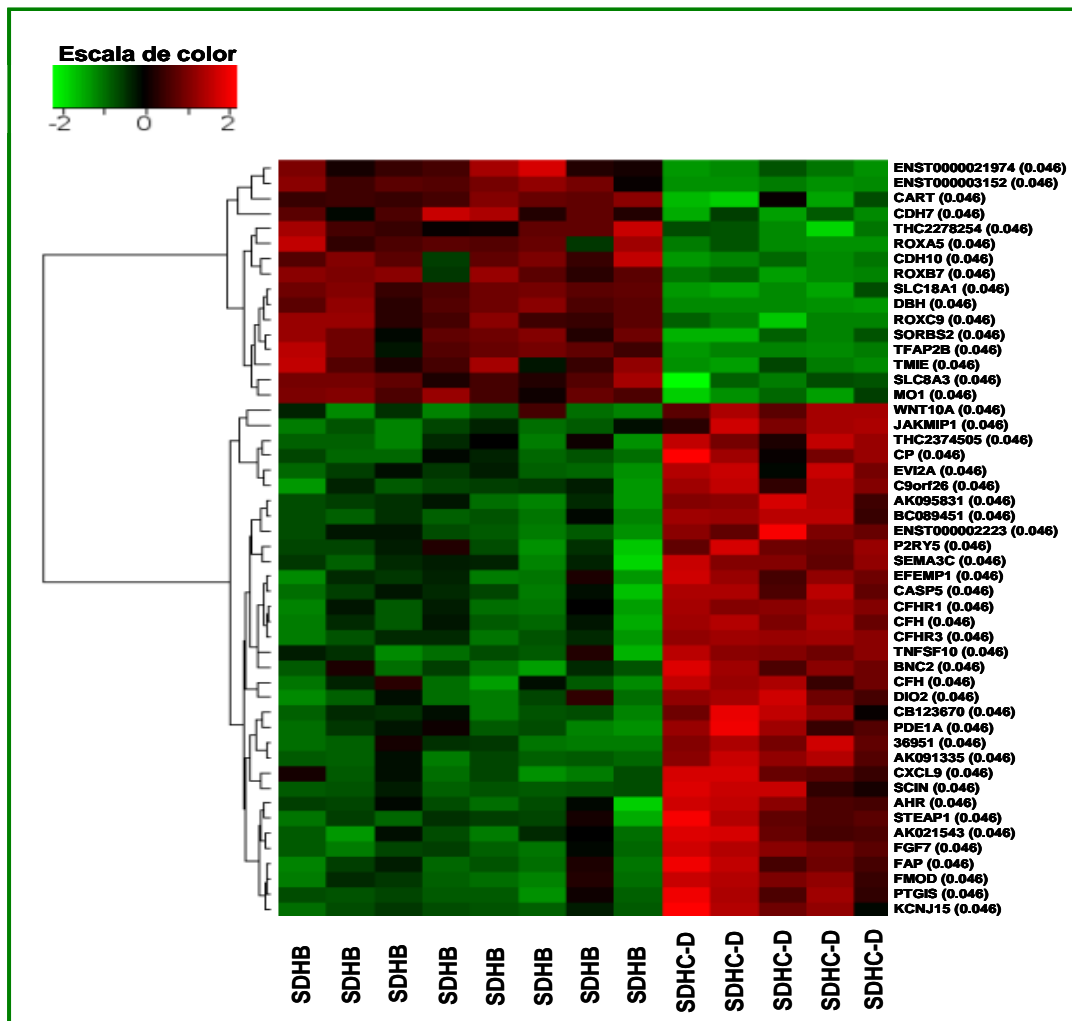


Figura 15. Representación de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística entre las clases SDHB y SDHC-D, extraída del programa Pomelo II.

El análisis funcional mediante GSEA dio como resultado que los tumores SDHB tenían dos rutas de *Biocarta* relacionadas con el Ciclo de Krebs enriquecidas en la comparación (MALATEX y KREB), así como otras dos relacionadas con p53 (P53 y ARF) (Tabla 8). Por su parte, los tumores con mutaciones en SDHC-D presentaban enriquecimiento de numerosas rutas apoptóticas dependientes de FAS y Ca^{2+} , así como varios procesos involucrados en la adhesión celular. En cuanto a las rutas de *KEGG*, varios procesos metabólicos relacionados con intermediarios del ciclo de Krebs aparecían también sobre-representados en los tumores SDHB, mientras que los tumores SDHC-D volvían a tener enriquecidas las rutas apoptóticas y de adhesión celular.

BIOCARTA	NES	NOM p-val
MALATEXPATHWAY	1,703	0,000
MRPPATHWAY	1,659	0,030
KREBPATHWAY	1,619	0,033
P53PATHWAY	1,603	0,041
ARFPATHWAY	1,457	0,042
FASPATHWAY	-1,647	0,008
CHEMICALPATHWAY	-1,612	0,013
NOS1PATHWAY	-1,607	0,011
CTLPATHWAY	-1,603	0,013
TCYTOTOXICPATHWAY	-1,597	0,025
MONOCYTEPATHWAY	-1,583	0,008
TCAPOPTOSISPATHWAY	-1,559	0,024
THELPERPATHWAY	-1,553	0,032
TNFR2PATHWAY	-1,543	0,048
KEGG	NES	NOM p-val
N-GLYCAN_DEGRADATION	1,672	0,000
ABC_TRANSPORTERS-GENERAL	1,682	0,003
GLYCAN_STRUCTURES-DEGRADATION	1,582	0,009
ALANINE_AND_ASPARTATE_METABOLISM	1,623	0,018
AMINOACIL-TRNA-BIOSYNTHESIS	1,566	0,032
STREPTOMYCIN_BIOSYNTHESIS	-1,566	0,015
CELL_ADHESION_MOLECULES_(CAMS)	-1,662	0,017
NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	-1,649	0,021
AUTOINMUNE_THYROID_DISEASE	-1,468	0,029
B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1,485	0,033
APOPTOSIS	-1,570	0,037
T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1,455	0,045
NUCLEOTIDE_SUGARS_METABOLISM	-1,501	0,045

Tabla 8. Tabla de resultados significativos de la comparación SDHB *versus* SDHC-D obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES muestra las rutas sobrerrepresentadas en SDHB y con signo negativo, las sobrerrepresentadas en SDHC-D.

2.8. Cluster 1: diferencias transcripcionales entre los tumores de cabeza y cuello esporádicos y los portadores de mutación

Para saber si había diferencias en el perfil de transcripción entre los tumores de cabeza y cuello esporádicos y aquellos asociados a mutación germinal, se aplicó un agrupamiento supervisado. Para ello se emplearon los 4 tumores SP y los 5 con mutaciones en *SDHD* o *SDHC*. De esta comparación no se pudo obtener ningún gen diferencialmente expresado atendiendo a los criterios de significación previamente establecidos. Sin embargo, un total de 104 genes (127 sondas) mostraron un *p*-valor menor de 0,05, de los cuales se muestran los 50 con un menor *p*-valor (Tabla 4MS).

Cabe destacar entre las rutas *Biocarta* más enriquecidas en los tumores SP, tres rutas relacionadas con mTOR (IGF1, MTOR y AKT) y la ruta de WNT (Tabla 5MS). Por su parte los tumores SDHC-D mostraron únicamente una ruta de control de ciclo celular (PTC1) sobre-representada. En cuanto a las rutas KEGG, los tumores SP

Las rutas *Biocarta* más destacadas dentro del grupo de tumores SP estaban relacionadas con la respuesta inmune (TH1TH2, GATA3, 341BB y INFLAM) o con la ruta de Notch (NOTCH y PS1), mientras que en los tumores RET, se encontraban enriquecidas la progresión del ciclo celular (PTC1 y G2) y varias rutas metabólicas (LEPTIN y MALATEX) (Tabla 6MS). La ruta KEGG de Notch estaba también sobrerrepresentada en los tumores SP, mientras que los tumores RET presentaban sobre todo rutas metabólicas y de control del ciclo celular entre las más enriquecidas.

2.10. Perfil transcripcional asociado con los tumores metastásicos: construcción de un Predictor

La ausencia de marcadores pronósticos eficaces hace que el único criterio aceptado hasta la fecha para considerar un PCC como maligno sea la presencia de metástasis. A esto hay que añadir la dificultad que existe a la hora de considerar qué casos son realmente benignos, dado que pueden desarrollarse metástasis hasta 10 años después de haberse diagnosticado el tumor primario. Para este estudio, se escogieron 6 tumores malignos (entre los casos había tumores SP, FPCC y SDHB) y 22 benignos (SP). Mediante el estudio supervisado de ambas clases, se obtuvo una lista de 642 genes (664 sondas) diferencialmente expresados ($FDR < 0,15$). Los 50 clones con una mayor significación estadística se muestran en la Figura17.

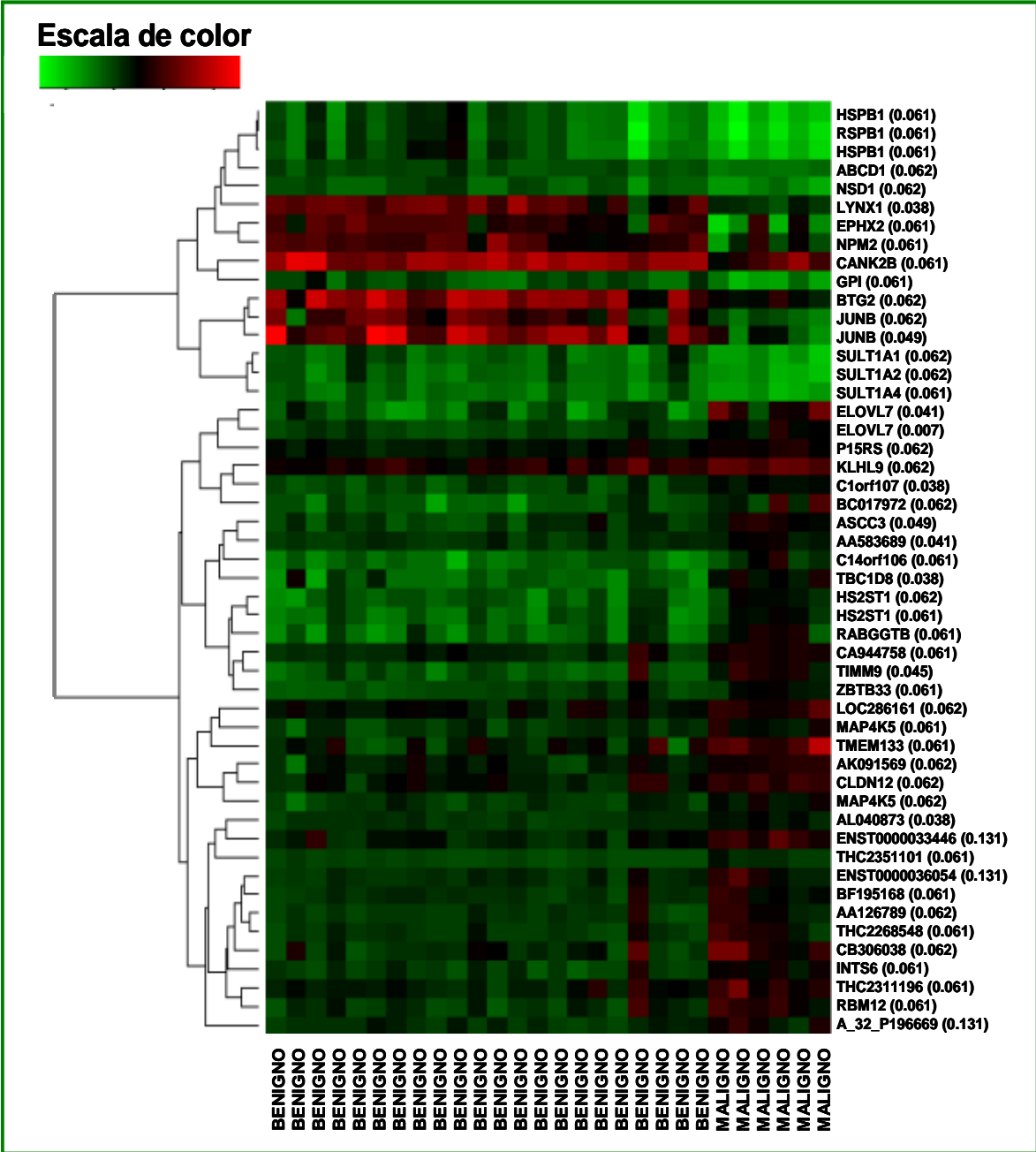


Figura 17. Representación de los 50 clones diferencialmente expresados con mayor significación estadística entre los tumores benignos y los malignos. Figura extraída del programa Pomelo II.

Mediante GSEA se pudo detectar un enriquecimiento de las rutas de movilidad celular y adhesión (UCALPAIN e INTEGRIN) en los tumores benignos.(Tabla 9). Tres rutas de *KEGG* estaban enriquecidas en los tumores malignos, mientras que los tumores benignos tenían, entre otras, las rutas de mTOR y de adhesión celular sobre-representadas.

BIOCARTA	NES	NOM p-val
ARAPPATHWAY	-1,708	0,004
GHPATHWAY	-1,604	0,006
GATA3PATHWAY	-1,614	0,012
IGF1PATHWAY	-1,461	0,014
UCALPAINPATHWAY	-1,700	0,016
RARRXRPATHWAY	-1,516	0,016
TPOPATHWAY	-1,549	0,017
INTEGRINPATHWAY	-1,598	0,018
CREBBPATHWAY	-1,460	0,021
TNFR2PATHWAY	-1,588	0,021
CBLPATHWAY	-1,612	0,022
HIFPATHWAY	-1,572	0,023
TRKAPATHWAY	-1,515	0,032
INSULINPATHWAY	-1,492	0,039
P35ALZHEIMERSPATHWAY	-1,555	0,047
KEGG	NES	NOM p-val
RIBOSOME	1,474	0,000
RNA_POLYMERASE	1,493	0,022
SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	1,477	0,047
MTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1,711	0,000
FC_EPSILON_RI_SIGNALIG_PATHWAY	-1,675	0,005
SULFUR_METABOLISM	-1,655	0,007
CELL_ADHESION_MOLECULES_(CAMS)	-1,483	0,046
ETHER_LIPID_METABOLISM	-1,365	0,047
GNRH_SIGNALING_PATHWAY	-1,386	0,048
PARKINSON_DISEASE	-1,500	0,049

Tabla 9. Tabla de resultados significativos de la comparación MALIGNOS *versus* BENIGNOS obtenidos mediante GSEA. El signo positivo del estadístico NES muestra las rutas sobrerrepresentadas en los casos MALIGNOS y el signo negativo, las sobrerrepresentadas en BENIGNOS.

El predictor obtenido mediante el programa *Tnasas*, tenía un alto porcentaje de error tanto cuando se utilizó el método SVM (28,6%), como cuando empleamos el método KNN (32,1%). Al comparar los genes obtenidos con ambos predictores, con los resultantes del estudio supervisado entre las clases BENIGNO y MALIGNO, se escogieron 15 genes diferencialmente expresados entre ambas clases, que se encontraban entre los empleados con mayor frecuencia en ambos métodos de predicción (Tabla 10). El estudio no supervisado utilizando los clones disponibles de estos 15 genes redujo el error de clasificación de los tumores hasta un 7,1%.

Gen	FDR Comparación Supervisada
ELOVL7	0,007
LYNX1	0,037
TBC1D8	0,037
TIMM9	0,045
JUNB	0,049
TMEM133	0,061
HSPB1	0,061
CAMK2B	0,061
EPHX2	0,061
NPM2	0,061
STX16	0,062
MAOB	0,069
TUBB2A	0,073
RABGGTB	0,075
BX110856	0,081

Tabla 10. Lista de los 15 genes, diferencialmente expresados entre tumores BENIGNOS y MALIGNOS, empleados con mayor frecuencia por los 2 predictores utilizados.

2.11. Perfil transcripcional de los casos familiares sin mutación (FPCC)

En principio, se disponía de 6 casos familiares sin mutación (tanto puntual como gran delección) en ninguno de los genes de susceptibilidad para desarrollar PCC conocidos. La distribución de estos 6 tumores FPCC en un mismo *cluster* del análisis no supervisado de todos los tumores, sugería que podían constituir un grupo homogéneo. Se llevó a cabo entonces un segundo análisis no supervisado de los 6 casos, que dio como resultado la separación de los tumores en dos grupos: FPCC1 y FPCC2 (Figura 18). El estudio molecular posterior del último gen de susceptibilidad identificado, *TMEM127*, permitió determinar que 2 de los casos inicialmente nombrados como FPCC1 eran portadores de mutaciones en este gen. El tercero de los casos FPCC1 resultó negativo para la búsqueda de mutaciones puntuales en *TMEM127*, aunque no se puede descartar la presencia de otro tipo de alteraciones en el gen, como reordenamientos germinales o mutaciones en alguno de los intrones que puedan afectar al proceso de *splicing*.

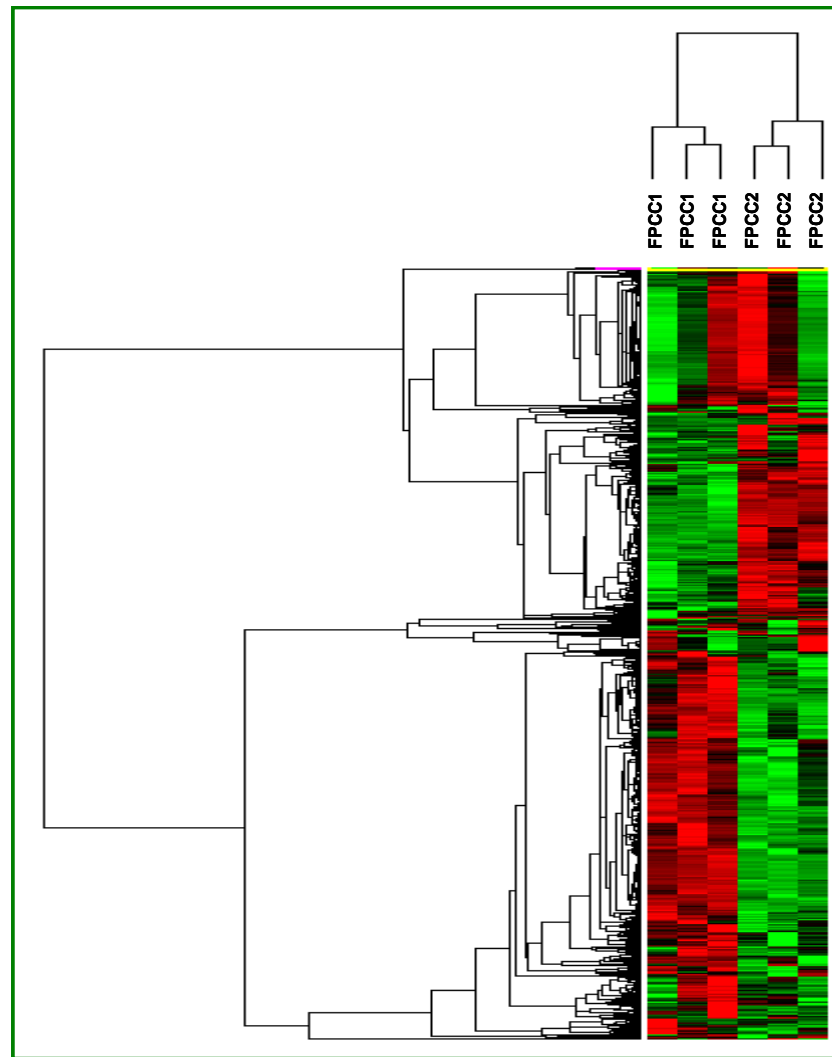


Figura 18. Representación gráfica del agrupamiento no supervisado de los casos FPCC, extraída del programa Pomelo II.

2.12. Validación de resultados mediante RT-qPCR

Para la validación de los resultados obtenidos al comparar las clases SDHB y VHL, se eligieron 9 genes (6 de ellos sobre-expresados en la clase VHL y 3 en la clase SDHB) entre aquellos diferencialmente expresados con mayor significación estadística (Figura 13): *BNIP3*, *SPOCK2*, *SLC2A1*, *SLC16A3*, *JACKMIP1*, *Egln3*, *NPNT*, *CDH10* y *GFRA2*. Inicialmente, se validó el resultado en la misma serie de tumores utilizados para las hibridaciones sobre los *arrays*, escogiéndose 5 tumores con mutación en *SDHB* y 8 con mutación en *VHL*. En un segundo paso, se validó el resultado de 6 de los 9 genes seleccionados inicialmente (*BNIP3*, *SLC2A1*, *SLC16A3*, *SPOCK2*, *CDH10* y *Egln3*), utilizando una serie independiente de tumores embebidos en parafina: 6 con mutación en *SDHB* y 7 con mutación en *VHL*. Todos los genes mostraron niveles de expresión acordes al resultado obtenido con los *arrays*. La Figura 19 muestra el

resultado obtenido en seis de ellos pertenecientes tanto a los genes validados en tumores congelados como en parafinados.

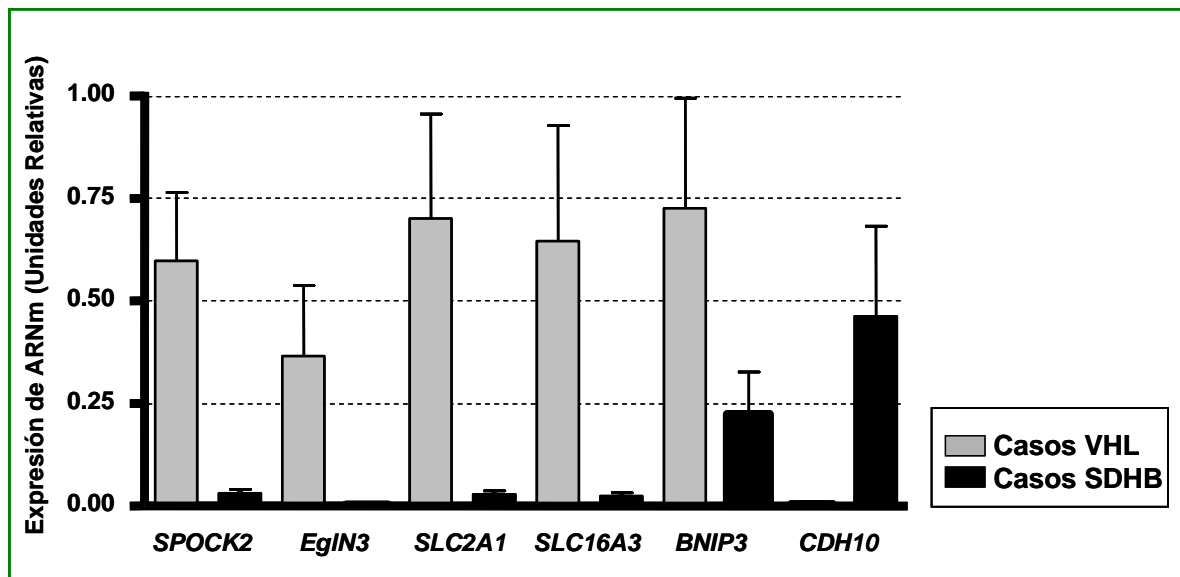


Figura 19. Gráfica representativa de los resultados obtenidos en la validación mediante RT-qPCR de seis de los genes diferencialmente expresados en la comparación VHL vs SDHB.

2.13. Expresión de *Egln3*

Dado que el gen *Egln3* mostraba una expresión diferencial significativa entre las clases SDHB y VHL, y teniendo en cuenta que era uno de los genes críticos en la ruta de desarrollo de PCC previamente descrita, se realizó un estudio más detallado de su expresión. En principio, un agrupamiento supervisado mostró que este gen se encontraba diferencialmente expresado en los tumores VHL al compararlos con el resto de tumores no-VHL (n=69) (Figura 20).



Figura 20. Representación de la expresión diferencial de *Egln3* en tumores VHL y no-VHL.

Para saber si la expresión diferencial encontrada entre las clases SDHB y VHL, se traducía en una diferencia en los niveles de proteína, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico de *Egln3* sobre 2 TMAs disponibles, que contenían 10 tumores SDHB y 10 casos VHL positivos. Un 50% (4/8) de los tumores VHL y un 66.6% (6/9) de los tumores SDHB mostraron una tinción positiva para *Egln3*, sin encontrarse

diferencias en cuanto al grado de tinción obtenido. En cuanto al resto de clases genéticas, el 29% de los RET (7/24), el 100% de los SDHD (4/4) y el 55.5% de los SP (5/9) se tiñeron también positivamente con anti-Egln3 (Figura 21).

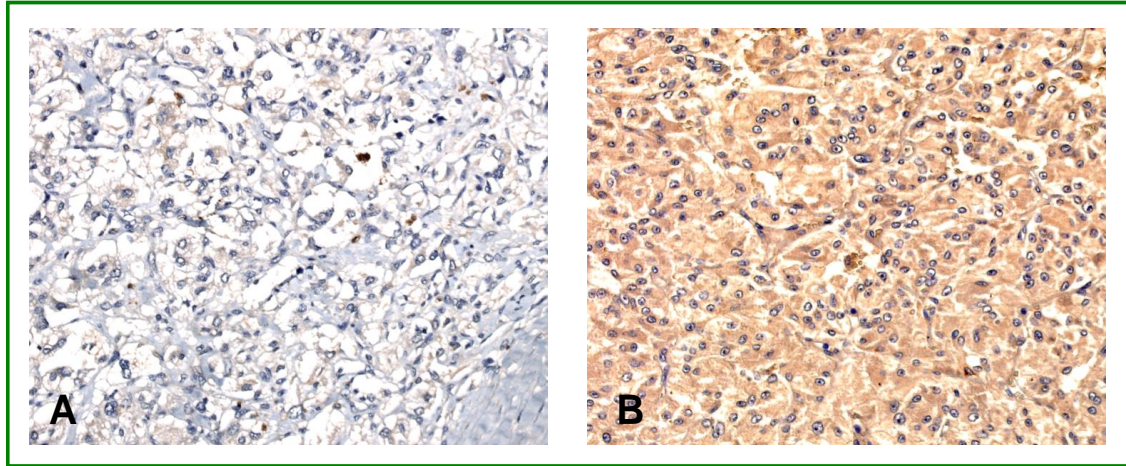


Figura 21. Imagen del estudio inmunohistoquímico de Egln3: A) Tumor VHL mostrando una tinción negativa; B) Tumor VHL con tinción positiva para Egln3

2.14. Hiper-metilación del promotor de *Egln3*

Todos los casos esporádicos de nuestra serie de PCCs/PGLs presentaban bajos niveles de expresión de *Egln3* comparados con los casos VHL. Ya que estos casos esporádicos no tenían ninguna alteración detectable en los genes de susceptibilidad a desarrollar PCC, se investigó si la presencia de hiper-metilación del promotor de este gen era la responsable. No se encontró ningún caso, entre los 31 tumores SP analizados, con metilación de las islas CpG de *Egln3*.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN BLOQUE I

*Caracterización molecular de pacientes con
PCCs/PGLs en población española*

1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PACIENTES

El descubrimiento durante los últimos 8 años de seis nuevos genes de susceptibilidad a desarrollar PCC/PGL eleva a 9 el número de genes conocidos relacionados con la enfermedad. Este hecho no solo explica que el porcentaje de pacientes portadores de una mutación germinal se haya visto incrementado, sino que el diagnóstico genético de la enfermedad se haya convertido en una tarea tremendamente compleja. A esto hay que añadir que todavía existen pacientes, un 1,2% según nuestros datos, con antecedentes familiares y sin mutación en ninguno de los 9 genes de susceptibilidad por lo que el “círculo genético” de esta enfermedad aún no está del todo cerrado.

En el presente trabajo se ha realizado el estudio completo de 7 de los genes de susceptibilidad descritos hasta la fecha, lo cual ha permitido detectar una mutación germinal en casi un 40% de los pacientes. El estudio no incluyó el análisis de *NF1* ni de *KIF1B β* , dado que no había en nuestra serie ningún paciente con una clínica sugestiva de estas enfermedades. Este porcentaje no sólo supera el 24-28% previamente descrito en estudios previos que no consideraban las grandes deleciones de los genes *SDH* [7, 14], sino que también es superior al 30% (excluyendo los casos *NF1*) recientemente publicado en una serie italiana en dónde sí se descartan los reordenamientos de la succinato deshidrogenasa [81]. Esta diferencia podría deberse al hecho de que encontramos varias mutaciones recurrentes en nuestra población (afectando especialmente a *SDHB*) que aumentan considerablemente el porcentaje de casos hereditarios. Por otra parte, este trabajo incluye por primera vez pacientes portadores de mutación en los dos últimos genes de susceptibilidad conocidos (*SDH5* y *TMEM127*).

1.1. Pacientes sindrómicos (*MEN2* y *VHL*)

La presencia de antecedentes sindrómicos de la enfermedad (MTC, hemangioblastoma, neurofibroma, etc), tanto en el propio paciente como en algún miembro de su familia, hacen que el test genético resulte especialmente sencillo y dirigido a un único gen candidato. Tal y como se esperaba, la presencia de antecedentes de *MEN2* o *VHL* llevó inequívocamente a la detección de la alteración genética subyacente en el 100% de los casos. En todos los casos la localización del tumor fue adrenal y ninguno de los pacientes presentó metástasis a distancia, lo cual se ajustaba a lo descrito en otras series de pacientes [81]. Más de un 60% de los casos para ambas condiciones sindrómicas eran además bilaterales. La bilateralidad de los PCCs es un rasgo clínico que ha sido frecuentemente asociado a los síndromes *MEN2*

y VHL [12, 81, 121]. Por lo tanto, ante la ausencia de claros antecedentes sindrómicos (p.ej. una sospecha no probada de MTC), observada en más de un 40% de los casos estudiados en este trabajo, la presencia de bilateralidad hubiera sido suficiente para iniciar el test genético de *RET* o *VHL*.

En cuanto a la edad de aparición de PCC, esta fue significativamente más elevada en los casos índice con mutación en *RET* ($p=0,0013$). La edad media de aparición de PCC en nuestros casos era muy similar a la descrita en pacientes MEN2A pertenecientes a la población española (38 años), y a la encontrada en pacientes europeos (36 años) [2, 81], aunque en estos trabajos no se encontraba una diferencia significativa con la edad media de aparición de PCC en pacientes VHL. No obstante, según nuestros datos una edad temprana de aparición en un paciente con PCC bilateral, en ausencia de cualquier otra característica sindrómica, indicaría la necesidad de priorizar el estudio del gen *VHL*.

1.2. Pacientes no sindrómicos

En pacientes con PCC/PGL y sin antecedentes sindrómicos de MEN2 o VHL, se suele realizar un estudio secuencial de todos los genes relacionados con la enfermedad hasta la detección de una mutación en alguno de ellos. Este procedimiento conlleva, en muchos casos, un gasto considerable para el Sistema Nacional de Salud y puede retrasar el resultado del test varios meses con el consiguiente perjuicio para el paciente y su familia. Por lo tanto, se hace necesario la caracterización genética de grandes series de pacientes sin antecedentes sindrómicos claros, que nos permita un mayor conocimiento de la implicación de cada gen en esta enfermedad “multigénica”.

Más de un 80% del total de casos incluidos en este estudio presentaban una condición clínica no sindrómica y por tanto no asociada *a priori* con MEN2 o VHL. De los 211 casos incluidos en este apartado, un 26% (55 pacientes) presentaban una mutación germinal en alguno de los genes de susceptibilidad, similar al 22% descrito en otros trabajos [81]. El gen más frecuentemente alterado en este grupo de pacientes fue *SDHB*, siendo el causante de la enfermedad en más de la mitad de los casos. Si consideramos el total de los pacientes incluidos en este trabajo, sindrómicos y no sindrómicos, las mutaciones en *SDHB* explicarían un 11,3% de ellos. Este porcentaje es superior al ~7% previamente descrito en una serie de pacientes franceses [7] y al ~5% descrito en una serie italiana [81]. Una posible explicación podría ser que la serie francesa no contemplaba el estudio de grandes deleciones de los genes *SDH*. De hecho, un estudio posterior ampliado de la misma serie describe que un 9% de las mutaciones de los genes *SDH* se deben a este fenómeno [67]. Por otro lado, el estudio

italiano, de diseño similar al nuestro, no describe la presencia de mutaciones recurrentes lo cual fue una de las características de nuestra serie de pacientes españoles, en la que casi la mitad de los pacientes con mutación en *SDHB* tenía alguna de estas dos mutaciones: c.1-10413_73-3866del y c.166_170delCCTCA (Tabla 5). Este último dato es, probablemente, el que explicaría la alta tasa de mutaciones encontrada en nuestra serie de pacientes.

1.2.1. Casos con antecedentes familiares

Como se esperaba, la presencia de antecedentes familiares en los casos no sindrómicos estaba claramente asociada ($p < 0,001$) con el hallazgo de una mutación germinal en alguno de los genes de susceptibilidad. El gen *SDHB* fue de nuevo el que presentaba más mutaciones, sobre todo en pacientes con tumores aislados de localización abdominal. En el caso de los pacientes con mutación en el gen *SDHD*, la presencia de tumores en la región de la cabeza y el cuello y la bilateralidad se daban, de forma significativa, más frecuentemente que en los pacientes con mutaciones en *SDHB*. En cuanto a los pacientes con mutación en *VHL*, la presencia de bilateralidad en los PCCs fue, al igual que ocurría con los casos sindrómicos, la característica clínica más relevante. El tipo de mutación encontrada en estos casos no parecía tener una clara relación con un fenotipo 2C de la enfermedad VHL, salvo en el caso p.Tyr175Cys [51]. El único caso con mutación en *RET* desarrolló también un tumor adrenal bilateral y, sorprendentemente, ni el probando ni su único familiar portador desarrollaron MTC.

Entre los casos positivos en el test de mutaciones, cabe destacar dos familias portadoras de mutación en los últimos genes de susceptibilidad descritos hasta la fecha: *SDH5* y *TMEM127*. La mutación en el gen *SDH5* se detectó en una familia con PGLs de cabeza y cuello como único rasgo clínico (Figura 8) y con una herencia que encajaba con el *imprinting* materno recientemente descrito para las mutaciones en este gen [42]. Llamaba la atención en esta familia tanto la edad temprana de desarrollo de los tumores en los tres miembros de la segunda generación, como el curso aparentemente indolente del padre portador (Bayley y col., en prensa). Es evidente que, de nuevo, hay factores genéticos modificadores del fenotipo que, por el momento, son totalmente desconocidos y que complican el consejo genético que se ofrece a estas familias. Por otra parte, se encontró una única familia con PCC como portadora de mutación en el gen *TMEM127*. La edad media de diagnóstico de los dos miembros afectados de esta familia fue de 40 años, similar a la observada en portadores de mutaciones en este gen (45,3 años) (comunicación personal de la Dra. Patricia Dahia) y a la encontrada en los casos esporádicos (46,7 años). Esto hace que un supuesto

caso *de novo* *TMEM127* sea por el momento indistinguible de un paciente esporádico. En este caso, aunque los tumores encontrados en la familia *TMEM127* eran unilaterales (Figura 8), la presencia de bilateralidad, también observada en estas familias, podría ser de ayuda en el manejo clínico. Dado que analizamos ambos genes en todos los pacientes negativos para mutaciones, sin atender a ningún criterio de selección previo, y que sólo encontramos mutaciones en pacientes con historia familiar, no parece que su implicación global en la enfermedad vaya a ser muy destacable.

Por último, se disponía de tres pacientes con antecedentes familiares que resultaron negativos para el estudio de los 9 genes de susceptibilidad, sugiriendo que todavía existe algún otro gen/genos por identificar. En este sentido, Dahia y col. [97] describieron, junto con el locus que finalmente ocupa *TMEM127*, otro locus en la posición cromosómica 16p13 que podría albergar un nuevo gen de susceptibilidad relacionado con el desarrollo de PCC que explique alguno de los 3 casos familiares sin mutación de nuestra serie.

1.2.2. Casos sin antecedentes familiares

En los pacientes no sindrómicos, la ausencia de antecedentes familiares hace necesario considerar otros aspectos de la enfermedad que ayuden a la hora de decidir cuál es el test genético más adecuado. Entre ellos se incluye: la bilateralidad /multiplicidad, la localización del tumor, la edad de diagnóstico y la presencia de metástasis.

Multiplicidad y Bilateralidad

En ausencia de antecedentes familiares, la multiplicidad constituye una de las características clínicas con una asociación más clara con la presencia de una mutación germinal ($p < 0,001$). En nuestra serie, la presencia de tumores múltiples (con más de dos localizaciones distintas en órganos no pares) constituye un claro indicio de una alteración germinal en los genes *SDH*. Aunque se ha descrito una mayor presencia de tumores múltiples en pacientes con mutaciones en *SDHD* [67], ésta parece asociada a distintas localizaciones en la región de la cabeza y el cuello, mientras que los tumores múltiples en localizaciones abdominales se asociarían casi exclusivamente a mutaciones en *SDHB*. Este hecho resulta paradójico si se tiene en cuenta que más de un 40% de los pacientes con mutación en *SDHB* de nuestra serie presentaban un único tumor. La escasa incidencia de casos con mutación en *SDHC* hace que sea difícil asociar las

mutaciones en este gen con un fenotipo concreto, aunque parece que la presencia de bilateralidad o multiplicidad en estos pacientes es bastante rara [73]. De nuevo, la bilateralidad en los PCCs se asoció significativamente con la presencia de mutaciones en el gen *VHL* ($p<0,001$). La presencia de bilateralidad está claramente asociada con la presencia de una predisposición hereditaria a desarrollar cáncer. En pacientes con PCCs, este hecho no sólo se confirma sino que se asocia casi exclusivamente con la presencia de mutaciones en los genes *VHL* o *RET* [7, 81]. Nuestros resultados confirman por lo tanto, la necesidad de empezar el test genético por *VHL* en el caso de tumores adrenales bilaterales sin antecedentes de la enfermedad, especialmente en el caso de que su secreción sea noradrenérgica [7].

Localización y edad

Cuando tenemos en cuenta únicamente la localización de los tumores, parece claro que la aparición de un tumor en una localización extra-adrenal está asociada con la presencia de una mutación germinal (Tabla). Este hecho, previamente descrito [6, 7] parece si cabe más acusado para los tumores extra-adrenales de localización abdominal o torácica de nuestra serie ($p<0,001$). En estos casos, casi la mitad de los pacientes presentaba una mutación, siendo el gen *SDHB* el implicado en más del 80% de ellos. Este hallazgo coincide con lo descrito en otras series [67] por lo que parece clara la recomendación del estudio genético de *SDHB* en todo paciente que desarrolle un tumor extra-adrenal. En el caso de tumores con localización en la región de la cabeza y el cuello, la búsqueda de mutaciones en el gen *SDHD*, sobre todo en pacientes jóvenes (edad media de 26 años en nuestra serie) parece también más que justificada. Sólo en el caso de pacientes negativos para mutaciones en *SDHD* se llevaría a cabo un estudio posterior en el resto de genes *SDH*. Por último, la localización adrenal de los tumores es una característica más asociada con un tumor esporádico que con un caso hereditario. En estos pacientes, el test genético se justifica sólo en los casos con alguna otra característica clínica indicativa de una enfermedad hereditaria (edad temprana de diagnóstico, bilateralidad o presencia de metástasis). Cabe destacar que si considerásemos la edad de los portadores de mutación en *SDHB*, no sólo la de los casos índice, la penetrancia de las mutaciones en este gen sería mucho menor que la descrita (50% a los 35-45 años) [6, 122]. Esto hace que sea muy difícil distinguir a estos casos, frecuentemente asociados a la presencia de tumores aislados, de los pacientes esporádicos.

Malignidad

En nuestra serie, la aparición de metástasis se asoció significativamente a la presencia de una mutación germinal ($p<0,001$), casi exclusivamente en el gen *SDHB*. De hecho, en torno a un 50% de nuestros casos con metástasis, con o sin antecedentes familiares, presentó una mutación en *SDHB*. Este porcentaje varía del 20 al 29% en otras series de pacientes [7, 81] y supera el 73% en casos extra-adrenales [67]. Por otra parte, casi un 38% del total de casos con mutación en *SDHB* de nuestra serie eran malignos. Este porcentaje, mayor que los previamente descritos en varios trabajos (14-28%) [81, 122, 123], es sin embargo muy similar al 37,5% descrito en una serie de pacientes franceses [67]. Las mutaciones germinales en *SDHB* han sido asociadas en numerosas ocasiones con la presencia de metástasis [123-125], sin embargo hasta la fecha no existe una explicación para este fenómeno. Se ha sugerido que la propia localización de los tumores primarios tendría más importancia que la alteración genética subyacente [123, 126]. De hecho, mientras que hasta un 82% de los tumores malignos *SDHB* se encuentran en una localización abdominal extra-adrenal [123, 127], la presencia de mutaciones germinales en tumores adrenales (PCCs) malignos es a menudo inexistente [126]. En nuestra serie, encontramos un porcentaje de casos malignos con tumores abdominales similar al de casos malignos con mutación en *SDHB*, por lo que parece que la localización del tumor primario es fundamental en el potencial maligno de estos tumores. En todo caso es absolutamente necesaria la recomendación de realizar el test de mutaciones en *SDHB* en los casos con metástasis. Cabe destacar, que no existe ninguna asociación entre el tipo de mutación encontrada en *SDHB* y la malignidad de los tumores.

Por otra parte, encontramos metástasis en un 25% de los casos con mutación en *SDHD* (3 pacientes), porcentaje muy superior al descrito en otros trabajos: 4,3% [81] y 3% [67, 122]. Si bien la diferencia en los porcentajes puede ser debida al tamaño muestral, es interesante destacar que dos de los tres casos desarrollaron un tumor primario en localización abdominal, lo que sugiere que la localización del tumor parece ser, de nuevo, más importante que la alteración genética subyacente. Sin embargo no podemos descartar que la propia mutación (c.129G>A) sea la que está relacionada con la malignidad en nuestros pacientes *SDHD*, ya que esta mutación se hallaba presente en dos de los tres casos y además había sido anteriormente descrita en pacientes con metástasis [44, 68, 75].

Estudio de efectos fundadores

La presencia de efectos fundadores en una población constituye una herramienta muy útil, no sólo desde el punto de vista del diagnóstico genético, sino también para conocer el origen de las mutaciones y como éstas se dispersan. En relación a los genes *SDH*, hasta la fecha son muy pocas las mutaciones fundadoras descritas [128-131], debido en parte a la escasa prevalencia de la enfermedad y al tipo de herencia: *imprinting* materno en *SDHD* y baja penetrancia en *SDHB*. Aunque los 24 portadores de la mutación c.1-10413_73-3866 compartían un mismo haplotipo, éste era bastante frecuente en la población española (30%). Sin embargo, la procedencia geográfica de 5 de las 7 familias portadoras (Figura 7MS), sirvió para confirmar su origen común [30]. La mutación c.166_170delCCTCA, descrita por primera vez en un paciente español [6], fue encontrada en 7 casos índice aparentemente no relacionados, por lo que se sospechó que pudiera tener un origen español. La presencia de la mutación en un mismo haplotipo infrecuente en la población española en los 9 portadores de la mutación (1,05%), seguía apuntando hacia un origen ibérico de la mutación. Además, gracias a una comunicación personal (Dr. Persu, Bruselas) se pudo conocer que esta misma mutación había sido detectada en un paciente judío sefardí cuyos ancestros dejaron España en 1453 [132], por lo que ésta alteración constituye la segunda mutación fundadora española en *SDHB* [30]. Con respecto a la mutación c.129G>A de *SDHD*, todos los portadores de la mutación compartían un mismo haplotipo raro en la población española (0 – 0,73%). Además, cuatro de los cinco pacientes franceses portadores de la mutación tenían un ancestro español, así como otro caso recientemente descrito en la literatura [133]. Finalmente, y a pesar de que las cuatro familias portadoras de la mutación c.334_337delACTG de *SDHD* compartían un haplotipo infrecuente (0,47 – 4,95%), esta variante había sido previamente descrita en cinco pacientes franceses [44], por lo que el origen de esta variante resulta de momento incierto. La presencia de un gran número de delecciones entre las mutaciones fundadoras recurrentes encontradas en nuestra serie, sugiere que la PCR-multiplex, que detecta tanto micro- como macrodelecciones, sería la técnica idónea para comenzar el test de mutaciones en estos genes.

Pacientes “aparentemente esporádicos”

Cuando nos encontramos ante un paciente con un único PCC/PGL, en el que no se refieren antecedentes personales o familiares de la enfermedad o de algún síndrome relacionado, el test genético de la enfermedad se complica si cabe aún más. En estos casos, sólo la localización del tumor o la edad de aparición de la enfermedad sirven como guía para el diagnóstico genético. Más de un 12% de los pacientes

clasificados como “aparentemente esporádicos” en nuestro estudio fueron portadores de una mutación germinal. Esta alta frecuencia de mutaciones, encontrada también por otros grupos [81], no resulta sorprendente si se tiene en cuenta el elevado número de mutaciones encontradas en el gen *SDHB*, que como ya se ha mencionado anteriormente se asocia con la aparición de tumores aislados [6]. Si tenemos en cuenta la localización del tumor, de nuevo la presencia de tumores en localización abdominal o torácica estaba claramente asociada con la presencia de una mutación germinal, fundamentalmente en *SDHB*. El bajo número de portadores de mutaciones entre los pacientes con tumores en la cabeza y el cuello de nuestra serie, podría explicarse porque las mutaciones en *SDHD* suelen estar asociadas con una multiplicidad de la enfermedad [121]. Finalmente, los pacientes con tumores adrenales aislados tienen una probabilidad muy baja de presentar una mutación germinal, y en caso de tenerla, de nuevo *SDHB* es el gen más frecuentemente implicado.

Cuando estratificamos los pacientes en función de la localización del tumor, y tomamos como edad umbral una edad ligeramente por debajo de la edad media de aparición de un tumor esporádico (45 años), encontramos una asociación significativa ($p=0,002$) entre la aparición de un tumor en localización toraco-abdominal con menos de 45 años y la presencia de una mutación en *SDH*, especialmente en *SDHB* (Figura 22). En cuanto a los pacientes con tumores en la región de la cabeza y el cuello o en la zona adrenal (PCC), no se encontró ninguna asociación entre la presencia de una mutación germinal y la edad de aparición del tumor (Figura 22).

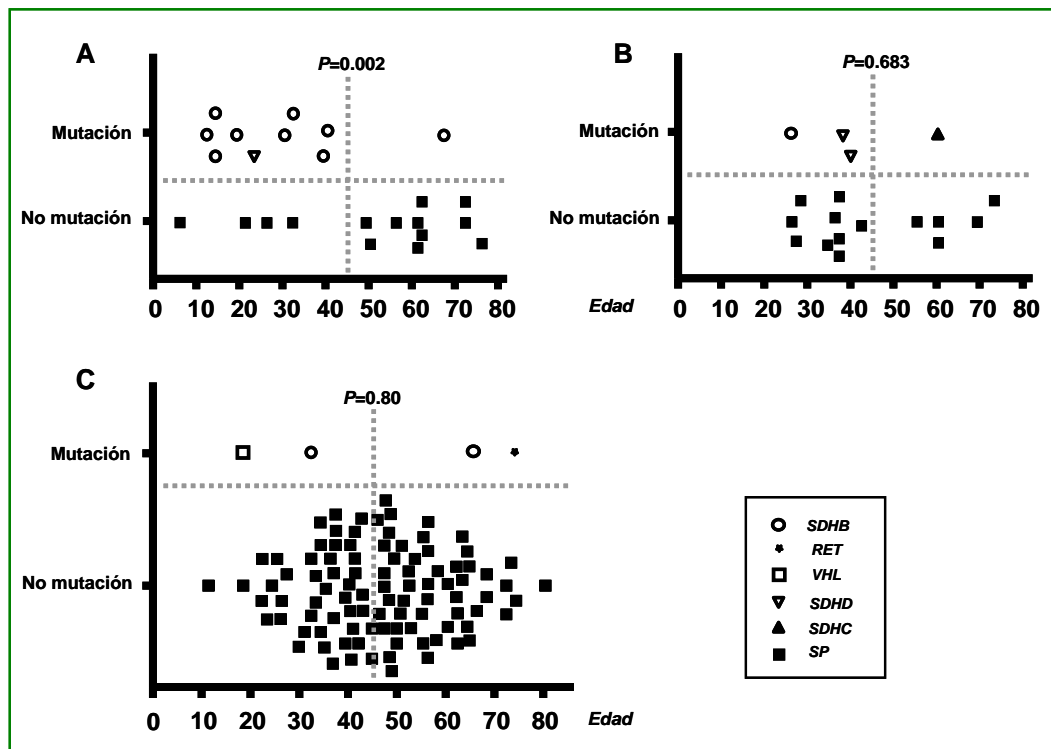


Figura 22. Representación de los casos aparentemente esporádicos en función de su localización. A) Localización retroperitoneal-torácica. B) Localización de tumor en cabeza y cuello. C) Localización adrenal. Las líneas discontinuas verticales marcan una edad de 45 años.

Tan sólo un 2,7% del total de casos diagnosticados por encima de los 45 años de edad, independientemente de la localización, presentó una mutación, dos de ellos en *SDHB*. Por lo tanto, y dado que el análisis de este gen asociado a malignidad está recomendado siempre en pacientes con PGL, independientemente de la edad de diagnóstico de la enfermedad, una edad de 45 años podría constituir un umbral útil para un algoritmo de manejo clínico (Figura 23) [134]. De este modo, en el caso de pacientes con PCC y menores de 45 años, proponemos un estudio secuencial de *VHL* primero y *SDHB* después. El estudio de *RET* estaría indicado, en último lugar, sólo en casos menores de 45 años, aunque en nuestra serie aparezca anecdóticamente un paciente de más de 70 años de edad con mutación en este gen. En el caso de pacientes con tumores retroperitoneales o torácicos, el primer gen a analizar, independientemente de la edad, es *SDHB* y en caso de ser negativo se analizaría también *SDHD*, sólo en los menores de 45 años. Hasta la fecha, se han descrito muy pocos pacientes con tumores en esta localización y mutación en *SDHC*, por lo que este gen no se recomendaría en estos casos. Por último, todos los genes *SDH*, empezando por *SDHD*, deberían analizarse en pacientes que desarrollen un PGL en la cabeza y cuello antes de los 45 años, pero sólo *SDHB* y *SDHC* estarían recomendados en el caso de pacientes mayores de esta edad [135]. El desarrollo de un tumor aislado,

asociado a una mutación en *SDHD*, en un paciente mayor de 45 años sin antecedentes familiares constituiría un suceso realmente inusual. A esto habría que añadir la posibilidad de estudiar *SDH5* en pacientes con PGLs de cabeza y cuello desarrollados a edades tempranas, dado que el fenómeno de *imprinting* podría ocultar un caso familiar. Aunque algoritmos similares han sido propuestos por otros grupos [67, 81, 136], consideramos que las recomendaciones descritas en nuestro estudio, basadas en una serie de pacientes españoles, tienen una clara aplicación en los casos de origen peninsular.

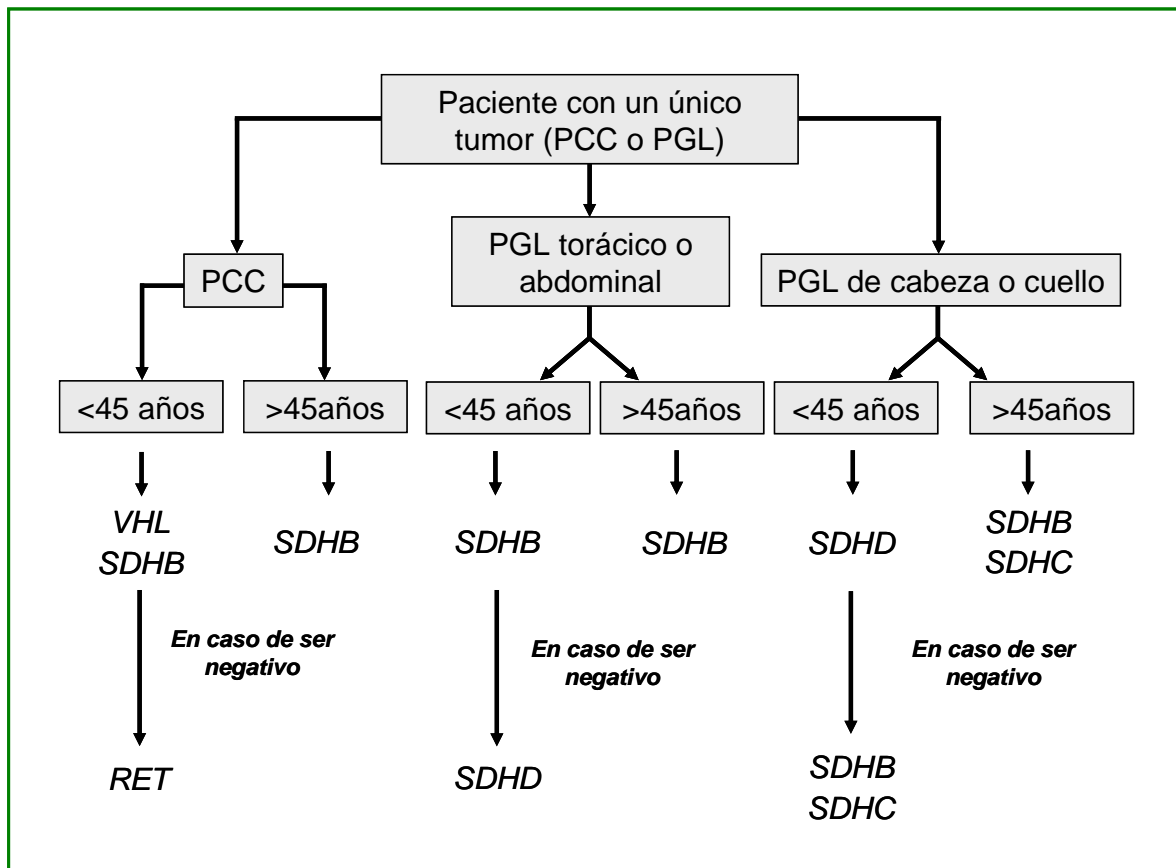


Figura 23. Esquema del algoritmo propuesto para la racionalización del test genético en pacientes no sindrómicos con un único tumor.

DISCUSIÓN BLOQUE II

*Perfiles transcripcionales de las diferentes
clases genéticas de PCCs/PGLs*

2. PERFILES DE EXPRESIÓN DE UNA SERIE DE PCCs/PGLs

Uno de los objetivos de la caracterización molecular y el posterior análisis transcripcional de nuestra serie de 84 PCCs/PGLs, que constituye la mayor serie analizada mediante *arrays* de expresión hasta la fecha, fue investigar si la heterogeneidad genética de estos tumores se traduce en su perfil transcripcional. El análisis detallado de los perfiles de expresión asociados con cada una de las clases genéticas, ha permitido identificar además firmas moleculares específicas relacionadas con la alteración subyacente. Así mismo, se han identificado algunas de las rutas principalmente alteradas en estas clases genéticas y posibles marcadores pronósticos asociados con dichas alteraciones. Por último, en el caso de los tumores con un comportamiento maligno, se han aplicado herramientas informáticas con el objeto de encontrar predictores de malignidad con una futura aplicación en la práctica clínica.

El agrupamiento no supervisado permitió la separación de los tumores en dos grandes grupos de acuerdo a su perfil global de expresión: VHL/SDH y RET/NF1 (Figura 9). Esta distribución de los PCCs/PGLs, dependiente de la alteración genética del tumor ya había sido descrita en un estudio previo [23]. En nuestra serie, se observa además que este agrupamiento es independiente de si la alteración es germinal o somática. La distribución de los casos esporádicos en cada uno de los *clusters* podría deberse a la presencia de mutaciones “ocultas” en genes relacionados con las rutas afectadas en las principales clases genéticas de PCCs/PGLs. De este modo, se sabe que los tumores con mutación en *TMEM127*, agrupados en el cluster RET/NF1, tienen alteraciones en la ruta de mTOR (comunicación personal de la Dra. Patricia Dahia) en la que NF1 parece tener un papel regulador importante [137].

2.1. La distribución transcripcional de los PCCs/PGLs depende de su firma hipóxica

El agrupamiento de los tumores VHL/SDH en un mismo *cluster* transcripcional había sido propuesto previamente por Dahia y col. [23], quienes concluyen que esta separación se debe a un perfil de expresión hipóxico común a los tumores VHL y SDH. El estudio de las rutas más representadas en los *clusters* principales de nuestro estudio mostró efectivamente una firma transcripcional hipóxica (representada principalmente por las rutas de HIF y VEGF) en el *cluster* VHL/SDH (Tabla 6). Merece la pena destacar que dos rutas relacionadas con Notch estaban sobre-representadas en los casos VHL/SDH, lo cual apoya la teoría de una firma hipóxica común para los

tumores SDH y VHL, dado que el dominio intracelular de Notch interacciona directamente con HIF-1 α [138]. Al comparar los perfiles de expresión de los dos *clusters* principales, encontramos que había 48 genes diana de HIF diferencialmente expresados (FDR<0.15) (Figura 11). De hecho, el agrupamiento no supervisado realizado únicamente con 141 genes diana de HIF (después de eliminar los patrones planos con SD=0,8) definió igualmente dos *clusters* principales, con tan sólo dos casos mal clasificados: 1 VHL y 1 RET (Figura 12). Entre las dianas de HIF sobre-expresadas en los tumores SDH/VHL se encontraban tanto genes involucrados en el Efecto Warburg (implicado en la entrada de glucosa en la célula y su metabolismo), como en la angiogénesis (*VEGF* y *PDGF*). Aunque no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de *HIF-1 α* , si que existía una sobre-expresión significativa de *HIF-2 α* en los tumores SDH/VHL. Además, *NOX4* recientemente descrito con un papel crítico para la actividad transcripcional de *HIF-2 α* [139] y *VEGF*, diana específica de *HIF-2 α* en ccRCCs con mutación en VHL [140, 141], se encontraban sobre-expresados en los casos SDH/VHL. Por lo tanto, parece que la desregulación de *HIF-2 α* es la responsable del perfil transcripcional hipóxico de los tumores SDH/VHL.

2.2. Los tumores VHL y los SDHB presentan perfiles de expresión significativamente diferentes

Aunque ya se conocía que los tumores VHL y SDH compartían un mismo perfil de expresión hipóxico [23], nada se sabe sobre las diferencias transcripcionales existentes entre ambas clases genéticas de PCCs/PGLs. Esto tiene una especial importancia dado que estas clases tumorales tienen características clínicas muy diferentes. Por ejemplo, los tumores con mutaciones en *SDHB* suelen desarrollarse como masas extra-adrenales con un alto riesgo de malignizar (hasta en un 38% de los casos en nuestra serie de pacientes), mientras que los tumores VHL suelen tener localización adrenal y es muy infrecuente que metastaticen [124, 142, 143]. Cuando comparamos los perfiles de expresión de los tumores VHL y SDHB, observamos, en primer lugar, una sub-expresión significativa del gen *SDHB* en los tumores SDHB. Se ha descrito que en los tumores VHL, HIF-1 α atenúa los niveles de la proteína SDHB inhibiendo a la enzima SDH, mientras que en los tumores SDH el acúmulo de succinato bloquea la degradación de HIF-1 α a través de la inhibición de la proil-hidroxilasa 3 (PHD3, también llamada EglN3) [23]. Nuestros resultados apuntan sin embargo a que la atenuación de los niveles de proteína SDHB descrita en los tumores VHL ha de producirse a nivel post-transcripcional. En cuanto a las rutas enriquecidas en ambas clases, la apoptosis era el proceso más enriquecido en los tumores VHL

(Tabla 7), mientras que varias rutas de interacción célula-célula y migración estaban sobre-representadas en la clase SDHB. Cabe destacar una sobre-expresión significativa de la cadherina *CDH10*, gen implicado en la adhesión de células neuronales, en los tumores SDHB en comparación no sólo con los tumores VHL sino con el resto de clases genéticas (FDR<0.001). Las moléculas de adhesión, incluidas las cadherinas, son conocidas por jugar un papel importante en la migración celular y la metástasis, por lo que las diferencias en la expresión de estas moléculas en los tumores SDHB (potencialmente malignos) podría servir para definir futuras dianas terapéuticas.

2.3. La desregulación de HIF-1 α diferencia los tumores VHL y SDHB

Sorprendentemente, un gran número de genes diana de *HIF* (n=41) estaban también diferencialmente expresados entre las clases VHL y SDHB, de los cuales 17 se encontraban ya en la lista de genes diferencialmente expresados en el *cluster* SDH/VHL (Figura 14). Cuando realizamos el análisis no supervisado usando los datos de expresión de 67 genes diana de HIF, los tumores VHL y SDHB se distribuyeron en dos grupos claramente diferenciados, demostrando que existía también una firma hipóxica diferente entre ellos. Diferencias en la expresión de *HIF* (1 y 2 α) y de sus genes diana ha sido descrita recientemente en PCCs VHL y SDH [140], lo que sugiere que existen mecanismos específicos de desregulación de HIF en estas clases tumorales. Ya que en nuestros casos no se apreciaban diferencias significativas en la expresión de HIF-2 α o VEGF, todo apunta a que la desregulación de HIF-1 α es la que explicaría la distinción entre ambas clases tumorales. De hecho, la expresión de 12 de los 67 genes diana de HIF empleados en el agrupamiento inicial era suficiente para distinguir entre los tumores VHL y los SDHB, y entre ellos se encuentran dianas canónicas de HIF-1 α como *BNIP3* y *SLC2A1* (*GLUT1*) [141, 144]. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión de genes, que como *SLC2A1* están involucrados en la activación de la glicolisis y el Efecto Warburg mediada por HIF-1 α , ha sido recientemente descrita como un mecanismo específico de PCCs VHL [96]. La inducción transcripcional de las dianas de HIF está profundamente influida por el tipo celular, y la abundancia relativa de las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α modula el fenotipo clínico de la enfermedad VHL [145]. Nuestros resultados sugieren que aunque ambos factores de transcripción, HIF-1 α y HIF-2 α , están desregulados en los PCCs VHL, existe una activación predominante de los genes diana de *HIF-1 α* que los diferencia de los *SDH*. Por último, cabe destacar que uno de los genes con una expresión diferencial más significativa entre los tumores SDHB y los VHL fue *Egln3*. Se sabe que

la sobre-expresión de este gen se activa indistintamente a través de los dos factores de transcripción HIF, siendo quizá *HIF-2 α* el principal inductor [146]. En cambio, nuestros resultados muestran que, al menos en los PCCs VHL, *HIF-1 α* desempeña un papel más importante en la sobre-expresión de *Egln3*.

2.4. La sobre-expresión de *Egln3* constituye un marcador de los PCCs VHL

La sobre-expresión de *Egln3* de los tumores VHL era evidente no sólo al compararlos con los tumores SDHB, sino con el resto de tumores de nuestra serie (FDR<0.05). Recientemente, se ha propuesto que seis de los genes de susceptibilidad a desarrollar PCC/PGL (*RET*, *VHL*, *NF1*, *SDHB*, *SDHC* y *SDHD*) pertenecen a la misma ruta apoptótica [32, 147] (Figura 24). En este modelo, las mutaciones en cualquiera de estos genes provocan una desregulación de la señalización del factor de crecimiento nervioso (NGF) y la consiguiente atenuación del proceso de muerte celular. Mientras que las mutaciones en *RET*, *NF1* y *VHL* inhiben al factor de transcripción pro-apoptótico c-Jun, la inactivación de los genes *SDH* lleva a la acumulación de succinato que a su vez inhibe la apoptosis inducida por *Egln3*. Por lo tanto, el desarrollo de un PCC/PGL dependería de la inhibición en algún punto de esta ruta. De hecho, recientemente se ha descrito la alteración en PCC y neuroblastoma de otra molécula situada por debajo de *Egln3* en esta ruta apoptótica [83, 84].

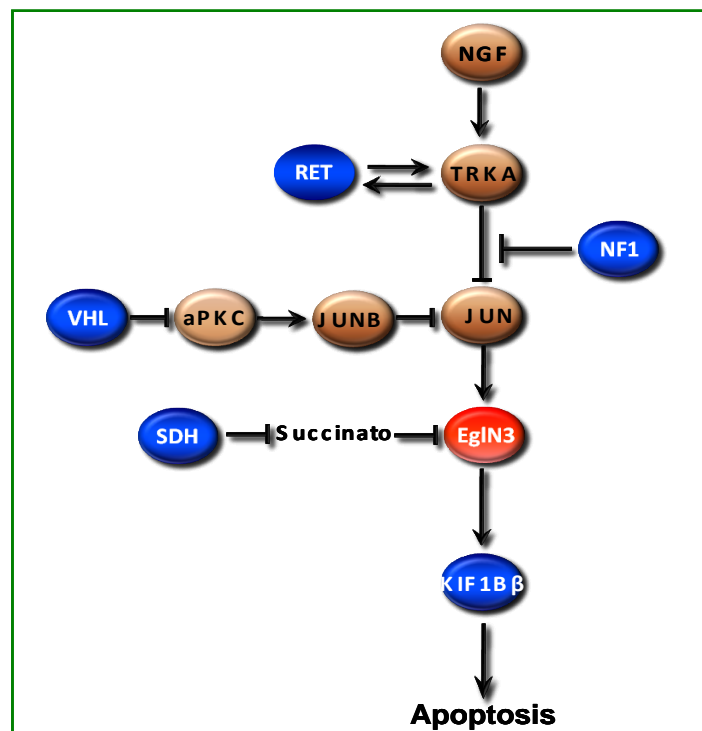


Figura 24. Representación de la ruta neuronal apoptótica propuesta por Kaelin y col [32, 147].

Egln3 codifica una de las proteínas de la familia EglN de prolin-hidroxilasas que incluye también a *Egln1* y *Egln2*. Se sabe que estas proteínas modifican específicamente residuos prolin de HIF- α para su ubiquitinación a través del complejo VHL-ubiquitin-ligasa y la consiguiente degradación en el proteosoma [148]. Aunque se ha sugerido que los tres miembros de la familia pueden hidroxilar a HIF-1 α *in vitro* [55], parece ser que *Egln1* es el principal modulador de esta molécula en normoxia, en un proceso dependiente de O₂ [149]. Según nuestros datos, *Egln3* es el único gen de la familia *EglN* sobre-expresado en los PCCs VHL. Estos resultados, junto con la firma hipóxica observada en los tumores VHL, sugieren que *Egln3* no realiza un papel esencial en la regulación de los niveles de HIF, o al menos en los de *HIF-1 α* (Figura 25).

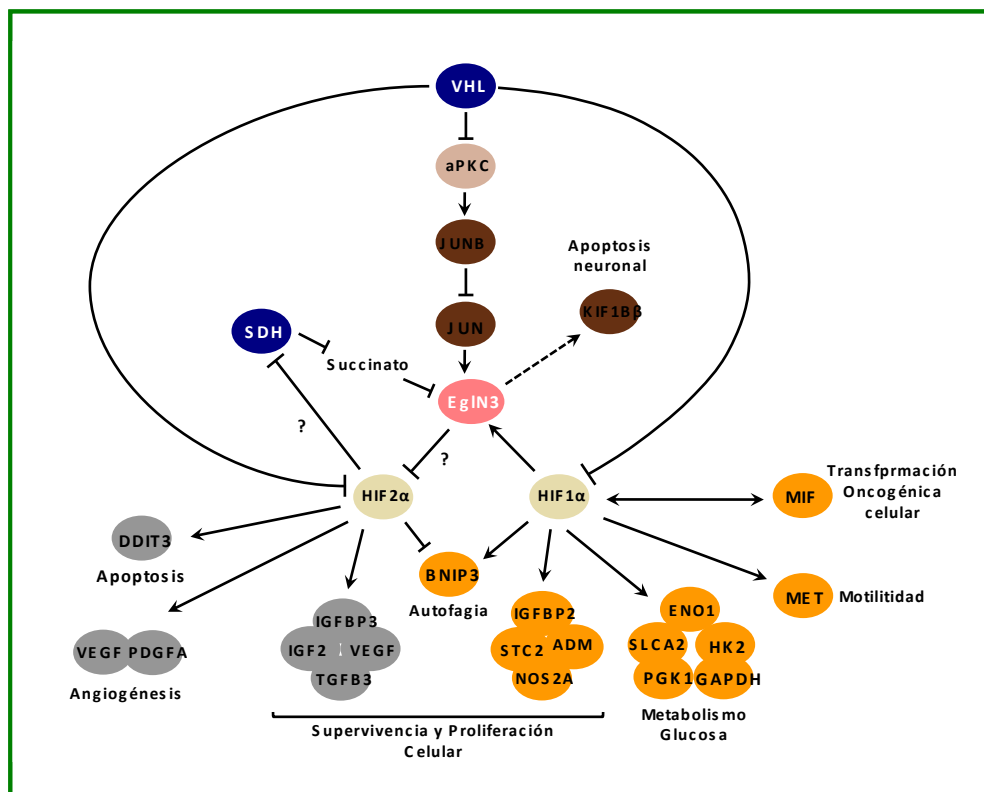


Figura 25. Modelo de ruta propuesto para el desarrollo de PCC en el caso de mutaciones en *VHL* o *SDH*.

Por otra parte, y tal como se ha comentado con anterioridad, se sabe que *Egln3* juega un papel importante en la muerte celular [32, 150] en donde las mutaciones de *VHL* inhiben la expresión de *Egln3* a través de la cascada de *JunB* [32]. Al mismo tiempo, las mutaciones de *VHL* pueden causar la acumulación de *Egln3*, y la activación del proceso de apoptosis neuronal a través de la desregulación de HIF- α [55]. Este fenómeno se ha visto en células con mutaciones en *VHL* de tipo 1, mientras que las células con mutaciones de tipo 2, asociadas con el desarrollo de PCC,

retendrían cierta capacidad para regular *HIF- α* y mantener bajos niveles de *Egln3* [55]. De hecho se ha propuesto que los alelos *VHL* con mutaciones de tipo 2C, asociados con PCC familiar, se comportan como alelos nativos en cuanto a la regulación de *HIF* [55]. En nuestro estudio, todos los PCCs *VHL* expresaron altos niveles de ARNm de *Egln3* al compararlos con el tejido adrenal normal, incluyendo un caso con una mutación representativa del fenotipo tipo 2C (p.Val84Leu). Es más, se detectó sobre-expresión de varios genes relacionados con el metabolismo de la glucosa (como por ejemplo *SLC2A1*) en los tumores *VHL* (n=15) comparados con el resto de tumores no-*VHL* (n=70) (FDR<0.05). Por lo tanto, la sobre-expresión de *Egln3* de los PCCs *VHL* se debe a la desregulación de HIF-1 α asociada con las mutaciones de *VHL*. Esta expresión de *Egln3*, que apenas se detecta en el tejido adrenal normal, está inducida en los PCCs *VHL* pseudo-hipóxicos y no parece limitar la activación fisiológica de HIF-1 α .

A pesar de lo anteriormente expuesto, no se apreciaron diferencias a nivel proteico entre las distintas clases genéticas de PCCs/PGLs (Figura 21). Con relación a este resultado, se sabe que la sobre-expresión de *Egln3* observada en líneas celulares de CRCC con mutación en *VHL* no redunda en diferencias a nivel proteico entre CRCC *VHL* y CRCC sin mutaciones en el gen [151]. Por tanto, tiene que existir algún otro mecanismo post-transcripcional que explique la aparente falta de concordancia entre los niveles altos de ARNm y de proteína. En cualquier caso, aunque la sobre-expresión del ARNm de *Egln3* no lleve a diferencias significativas en cuanto a los niveles de proteína, constituye un marcador inequívoco de esta a clase de PCCs/PGLs.

Mientras que los bajos niveles de expresión de *Egln3* en los PCCs hereditarios no-*VHL* (RET, NF1 y SDH) se explicaría por la mutación de alguno de los genes de susceptibilidad, los tumores esporádicos no presentan ninguna alteración conocida en la ruta apoptótica de desarrollo de PCC. Recientemente se ha descrito que en neoplasias de células plasmáticas la expresión de *Egln3* puede verse regulada por hiper-metilación de su promotor [152]. Por lo tanto, nos preguntamos si la sub-expresión de *Egln3* observada en nuestros tumores esporádicos podía deberse a una inactivación epigenética del gen. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la metilación de este gen no es un evento frecuente en PCCs esporádicos y que, por lo tanto, debe existir algún otro mecanismo responsable de la sub-expresión de *Egln3* observada en los PCCs esporádicos.

2.5. La sobre-expresión de *BNIP3* es específica de los PCCs VHL

Otro de los genes diana de *HIF* sobre-expresado en los PCCs VHL al compararlos con cualquier otra clase tumoral fue *BNIP3*. *BNIP3* es una proteína pro-apoptótica regulada positivamente por *p53* y *HIF-1 α* , y que a su vez está regulada negativamente por *HIF-2 α* , [141, 153, 154]. Se ha sugerido que los PCCs SDHB/D pierden la expresión de *BNIP3* de forma independiente de *HIF*, y que esta pérdida de expresión podría estar implicada en la transformación maligna de los PCCs SDHB [140]. En nuestra serie se observa, sin embargo, que *BNIP3* está también sub-expresado en el tejido adrenal normal y que además este hallazgo es común a todos los PCCs no VHL. Por lo tanto la sub-expresión de *BNIP3* no parece tener relación con el comportamiento maligno de los tumores SDHB. Por otra parte, se ha descrito que *BNIP3*, más que inducir la muerte celular, podría inhibir a ciertos genes requeridos para la biosíntesis mitocondrial así como promover la autofagia en situaciones de hipoxia celular (eliminando las mitocondrias dañadas) [155, 156]. Esta última función, relacionada también con el Efecto Warburg, podría explicar la sobre-expresión de esta molécula inducida por *HIF-1 α* en los PCCs más hipóxicos, los VHL.

2.6. El Ciclo de Krebs diferencia los tumores SDHB de los SDHD/C

A pesar de tener un perfil transcripcional muy similar, se pudieron observar diferencias significativas en la expresión de hasta 300 genes entre los tumores SDH con (SDHB) y sin (SDHC/D) potencial maligno. Desde un punto de vista funcional, parece que las mutaciones en el gen *SDHB* provocan una alteración más acusada de los genes involucrados en el Ciclo de Krebs. Aunque esto podría relacionarse con el potencial maligno de los tumores SDHB, la propia localización de los casos empleados en nuestro estudio (la cabeza y el cuello en los SDHD/C y la región toraco-abdominal en los SDHB) podría ser la que tuviera que ver con estas diferencias. A pesar de que se ha descrito que cualquiera que sea la alteración de la SDH, ésta produce una desestabilización del complejo y posiblemente lleve a su degradación [24], parece que los efectos ocasionados en la enzima son si cabe mayores en el caso de las mutaciones en *SDHB*. De hecho, la pérdida de la expresión de la proteína SDHB, recientemente propuesta como marcador de alteraciones en la enzima SDH, constituye un proceso somático necesario para el desarrollo de PCCs/PGLs en los síndromes paraganglionares [24]. Esto último se ve corroborado en nuestros casos SDHD/C, ya que los niveles de expresión de *SDHB*, aunque en menor medida que en los PCCs SDHB, se encuentran también reducidos.

2.7. Los PGLs de cabeza y cuello tienen un perfil transcripcional homogéneo, independientemente de su estatus genético

Todos los PGLs de cabeza y cuello de nuestra serie compartían el perfil transcripcional hipóxico de los tumores SDH/VHL, incluyendo los casos esporádicos. La ausencia de genes diferencialmente expresados de forma significativa entre los tumores de cabeza y cuello con (SDHD/C) y sin mutación, sugiere que los casos esporádicos podrían tener alteraciones en las mismas rutas o procesos biológicos que los tumores SDH. En este sentido, recientemente se han comparado los niveles de expresión de 13 PGLs de cabeza y cuello con mutación en SDH (*SDHD* y *SDH5*) y de 5 casos esporádicos [157]. Este estudio también mostró perfiles transcripcionales muy similares entre ambas clases de tumores. Si tenemos en cuenta la histopatología y el carácter benigno común a todos los PGLs de cabeza y cuello, independientemente de su estatus genético, no resulta sorprendente la homogeneidad transcripcional observada en este tipo de tumores paraganglionares.

2.8. Los PCCs esporádicos tienen un perfil transcripcional muy similar al de los tumores RET

Al igual que ocurría con los PGLs de cabeza y cuello, los tumores esporádicos de localización fundamentalmente adrenal, presentaban un perfil transcripcional muy homogéneo que los encuadraba en el *cluster* de tumores RET/NF1. Tras un estudio supervisado, tan sólo 67 genes diferenciaban significativamente a los casos esporádicos de los RET, la clase genética representativa de su *cluster* de tumores. El escaso número de genes diferencialmente expresados entre ambas clases de tumores podría ser debido bien a que el grupo de tumores esporádicos no constituye un grupo homogéneo genéticamente, o bien a que presenten alteraciones en alguna ruta relacionada con RET. Se necesitarían más estudios para discernir entre ambas posibilidades.

2.9. El predictor de malignidad presentó una alta tasa de error

Entre los más de 600 genes diferencialmente expresados entre los tumores malignos y los benignos, llamaba la atención *JunB*, uno de los genes clave de la ruta de apoptosis neuronal en la que se encarga de inhibir a *c-Jun* evitando así la muerte celular [147]. Se ha descrito que este gen puede desempeñar una función tanto pro-apoptótica como anti-apoptótica, en función del tipo de tejido y el estadio [158]. En nuestros casos, *JunB* se encontraba sobre-expresado en los tumores benignos,

mientras que los tumores malignos mostraban niveles de expresión similares a los del tejido adrenal normal. Por lo tanto los niveles de expresión de este gen no parecen ser un indicador de comportamiento maligno. En cuanto al predictor de malignidad, éste presentó finalmente una tasa de error del 7,1% siendo por tanto muy poco eficiente en la detección de un tumor maligno. Una posible explicación se encuentra en la propia heterogeneidad del grupo de tumores malignos que incluía PCCs SDHB, FPCC y SP. Por otra parte, el carácter benigno de un PCC/PGL es difícil de establecer dado que sólo la ausencia de metástasis permite determinar si un tumor es o no benigno. Teniendo en cuenta que estos tumores pueden metastatizar al cabo de muchos años, resulta muy difícil encontrar una serie de tumores benignos que sea realmente fiable.

2.10. La homogeneidad de los tumores FPCC2 sugiere la implicación de un único gen en estos casos

Aunque no se pudo encontrar ninguna mutación en el último tumor FPCC1 de nuestra serie, el hecho de que este caso compartiese el mismo perfil transcripcional que los tumores con mutación en *TMEM127*, nos hace pensar que este caso presente alguna otra alteración en el gen, no detectada mediante las técnicas utilizadas. En cuanto a los 3 tumores FPCC2, el reducido número de casos incluidos en esta clase hace que no haya sido posible llevar a cabo ninguna comparación hasta el momento. De todos modos, su perfil de expresión común sugiere la alteración de un mismo gen, posiblemente involucrado en alguna ruta relacionada con los genes representativos de este cluster: *RET*, *NF1* o *TMEM127*.

CONCLUSIONES

1. Casi un 40% de los pacientes con PCC/PGL es portador de una alteración germinal en alguno de los genes de susceptibilidad. La presencia de antecedentes así como de bilateralidad, multiplicidad, tumores abdominales/torácicos extra-adrenales, malignidad o una edad temprana en el momento del diagnóstico, permiten distinguir entre las distintas presentaciones sindrómicas y no sindrómicas de la enfermedad.
2. Aunque todavía no existen criterios claros de selección de pacientes para el estudio de *SDH5* y *TMEM127*, estos genes no parecen tener una implicación reseñable en la heredabilidad de los PCCs/PGLs, al menos en nuestra serie.
3. Existen varias mutaciones fundadoras recurrentes en la población española que deberían ser estudiadas en primer lugar en los pacientes a riesgo.
4. La presencia de un gran número de deleciones entre los portadores de mutaciones en los genes *SDH* sugiere que la PCR-multiplex, que detecta tanto micro- como macrodeleciones, es la técnica ideal para comenzar el test de mutaciones en estos genes.
5. En los casos “aparentemente esporádicos”, la subestratificación de acuerdo a la localización tumoral puede ayudar a diseñar un algoritmo útil para el test genético. En este algoritmo, 45 años puede ser el umbral por encima o por debajo del cual plantearse dicho test.
6. El perfil global de expresión observado en nuestra serie de PCCs/PGLs obedece a una diferente desregulación pseudohipóxica dependiente de HIF. De hecho, la diferente desregulación de HIF-1 y HIF-2, permite distinguir entre dos clases tumorales muy relacionadas, *SDHB* y *VHL*.
7. La sobre-expresión del ARNm tanto de *Egln3* como de *BNIP3*, constituye un marcador inequívoco que identifica PCCs con mutación en *VHL*. Tiene que existir algún mecanismo de regulación post-transcripcional de *Egln3* que explique la falta de concordancia entre los niveles de ARNm y de proteína observada en los PCCs-*VHL*.
8. Al compartir un mismo perfil de expresión, parece que los PGLs de cabeza y cuello esporádicos podrían presentar alteraciones somáticas en las mismas rutas que los que presentan alteraciones en la *SDH*.
9. No es posible obtener un predictor pronóstico eficaz para PCCs/PGLs debido, posiblemente, a la heterogeneidad genética de los tumores malignos de nuestra serie y a la posibilidad de estar incluyendo como benignos casos que puedan metastatizar años después.
10. La homogeneidad transcripcional de los tumores FPCC2 sugiere la existencia de un nuevo gen común de susceptibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lack, E.E., *Tumors of the adrenal gland and adrenal paraganglia. Atlas of tumor pathology. Major problems in pathology* ; v. 29. 1997, Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. x, 405.
2. Neumann, H.P. and C. Eng, *The approach to the patient with paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 2677-83.
3. Young, W.F., Jr., *Paragangliomas: clinical overview*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 21-9.
4. Manger, W.M., *An overview of pheochromocytoma: history, current concepts, vagaries, and diagnostic challenges*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 1-20.
5. Neumann, H.P., et al., *Evidence of MEN-2 in the original description of classic pheochromocytoma*. N Engl J Med, 2007. **357**(13): p. 1311-5.
6. Neumann, H.P., et al., *Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations*. Jama, 2004. **292**(8): p. 943-51.
7. Amar, L., et al., *Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(34): p. 8812-8.
8. Lenders, J.W., et al., *Phaeochromocytoma*. Lancet, 2005. **366**(9486): p. 665-75.
9. Fernandez-Calvet, L. and R.V. Garcia-Mayor, *Incidence of pheochromocytoma in South Galicia, Spain*. J Intern Med, 1994. **236**(6): p. 675-7.
10. Stenstrom, G. and K. Svardsudd, *Pheochromocytoma in Sweden 1958-1981. An analysis of the National Cancer Registry Data*. Acta Med Scand, 1986. **220**(3): p. 225-32.
11. Beard, C.M., et al., *Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979*. Mayo Clin Proc, 1983. **58**(12): p. 802-4.
12. Karagiannis, A., et al., *Pheochromocytoma: an update on genetics and management*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(4): p. 935-56.
13. Amar, L., et al., *Year of diagnosis, features at presentation, and risk of recurrence in patients with pheochromocytoma or secreting paraganglioma*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(4): p. 2110-6.
14. Neumann, H.P., et al., *Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(19): p. 1459-66.
15. Astrom, K., et al., *Altitude is a phenotypic modifier in hereditary paraganglioma type 1: evidence for an oxygen-sensing defect*. Hum Genet, 2003. **113**(3): p. 228-37.
16. Schulz, C., G. Eisenhofer, and H. Lehnert, *Principles of catecholamine biosynthesis, metabolism and release*. Front Horm Res, 2004. **31**: p. 1-25.
17. Grossman, A., et al., *Biochemical diagnosis and localization of pheochromocytoma: can we reach a consensus?* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 332-47.
18. Eisenhofer, G., et al., *Pheochromocytoma: rediscovery as a catecholamine-metabolizing tumor*. Endocr Pathol, 2003. **14**(3): p. 193-212.
19. Sahdev, A., et al., *CT and MR imaging of unusual locations of extra-adrenal paragangliomas (pheochromocytomas)*. Eur Radiol, 2005. **15**(1): p. 85-92.

20. Miskulin, J., et al., *Is preoperative iodine 123 meta-iodobenzylguanidine scintigraphy routinely necessary before initial adrenalectomy for pheochromocytoma?* Surgery, 2003. **134**(6): p. 918-22; discussion 922-3.
21. Gonias, S., et al., *Phase II study of high-dose [131I]metaiodobenzylguanidine therapy for patients with metastatic pheochromocytoma and paraganglioma.* J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4162-8.
22. Timmers, H.J., et al., *The effects of carbidopa on uptake of 6-18F-Fluoro-L-DOPA in PET of pheochromocytoma and extraadrenal abdominal paraganglioma.* J Nucl Med, 2007. **48**(10): p. 1599-606.
23. Dahia, P.L., et al., *A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas.* PLoS Genet, 2005. **1**(1): p. 72-80.
24. van Nederveen, F.H., et al., *An immunohistochemical procedure to detect patients with paraganglioma and phaeochromocytoma with germline SDHB, SDHC, or SDHD gene mutations: a retrospective and prospective analysis.* Lancet Oncol, 2009. **10**(8): p. 764-71.
25. Kinney, M.A., et al., *Perianesthetic risks and outcomes of pheochromocytoma and paraganglioma resection.* Anesth Analg, 2000. **91**(5): p. 1118-23.
26. Walz, M.K., et al., *Laparoscopic and retroperitoneoscopic treatment of pheochromocytomas and retroperitoneal paragangliomas: results of 161 tumors in 126 patients.* World J Surg, 2006. **30**(5): p. 899-908.
27. Eisenhofer, G., et al., *Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress.* Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(3): p. 423-36.
28. Brouwers, F.M., et al., *Low molecular weight proteomic information distinguishes metastatic from benign pheochromocytoma.* Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(2): p. 263-72.
29. Amar, L., et al., *Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(10): p. 3822-8.
30. Cascon, A., et al., *Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish patients.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(5): p. 1701-5.
31. He, J., et al., *Successful chemotherapy of hepatic metastases in a case of succinate dehydrogenase subunit B-related paraganglioma.* Endocrine, 2009. **36**(2): p. 189-93.
32. Lee, S., et al., *Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer.* Cancer Cell, 2005. **8**(2): p. 155-67.
33. Selak, M.A., et al., *Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase.* Cancer Cell, 2005. **7**(1): p. 77-85.
34. Jimenez, C., et al., *Use of the tyrosine kinase inhibitor sunitinib in a patient with von Hippel-Lindau disease: targeting angiogenic factors in pheochromocytoma and other von Hippel-Lindau disease-related tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(2): p. 386-91.

35. Joshua, A.M., et al., *Rationale and evidence for sunitinib in the treatment of malignant paraganglioma/pheochromocytoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 5-9.
36. Heutink, P., et al., *A gene subject to genomic imprinting and responsible for hereditary paragangliomas maps to chromosome 11q23-qter*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(1): p. 7-10.
37. Devilee, P., et al., *Allelotype of head and neck paragangliomas: allelic imbalance is confined to the long arm of chromosome 11, the site of the predisposing locus PGL*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **11**(2): p. 71-8.
38. Baysal, B.E., et al., *Fine mapping of an imprinted gene for familial nonchromaffin paragangliomas, on chromosome 11q23*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(1): p. 121-32.
39. Baysal, B.E., et al., *Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma*. Science, 2000. **287**(5454): p. 848-51.
40. Niemann, S. and U. Muller, *Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 268-70.
41. Astuti, D., et al., *Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(1): p. 49-54.
42. Hao, H.X., et al., *SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1139-42.
43. Neumann, H.P., et al., *Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma*. N Engl J Med, 2002. **346**(19): p. 1459-66.
44. Benn, D.E., et al., *Clinical presentation and penetrance of pheochromocytoma/paraganglioma syndromes*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(3): p. 827-36.
45. Cascon, A., et al., *Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma in Spanish patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2009.
46. Opocher, G., et al., *Familial nonsyndromic pheochromocytoma*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 149-55.
47. Raue, F. and K. Frank-Raue, *Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management*. Hormones (Athens), 2009. **8**(1): p. 23-8.
48. Maher, E.R. and C. Eng, *The pressure rises: update on the genetics of phaeochromocytoma*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(20): p. 2347-54.
49. Brandi, M.L., et al., *Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5658-71.
50. Eng, C., et al., *The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis*. JAMA, 1996. **276**(19): p. 1575-9.
51. Ruiz-Llorente, S., et al., *Genetic characterization and structural analysis of VHL Spanish families to define genotype-phenotype correlations*. Hum Mutat, 2004. **23**(2): p. 160-9.
52. Gimm, O., et al., *The genetic basis of pheochromocytoma*. Front Horm Res, 2004. **31**: p. 45-60.

53. Clifford, S.C., et al., *The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1alpha in renal cell carcinoma*. *Oncogene*, 2001. **20**(36): p. 5067-74.
54. Ong, K.R., et al., *Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease*. *Hum Mutat*, 2007. **28**(2): p. 143-9.
55. Kaelin, W.G., Jr., *The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(11): p. 865-73.
56. Eisenhofer, G., et al., *Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome*. *Endocr Relat Cancer*, 2004. **11**(4): p. 897-911.
57. Maher, E.R., *Von Hippel-Lindau disease*. *Curr Mol Med*, 2004. **4**(8): p. 833-42.
58. Cascon, A., et al., *SDHB mutation analysis in familial and sporadic pheochromocytoma identifies a novel mutation*. *J Med Genet*, 2002. **39**(10): p. E64.
59. Peczkowska, M., et al., *Extra-adrenal and adrenal pheochromocytomas associated with a germline SDHC mutation*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008. **4**(2): p. 111-5.
60. Briere, J.J., et al., *Succinate dehydrogenase deficiency in human*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(19-20): p. 2317-24.
61. Tomlinson, I.P., et al., *Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer*. *Nat Genet*, 2002. **30**(4): p. 406-10.
62. McWhinney, S.R., B. Pasini, and C.A. Stratakis, *Familial gastrointestinal stromal tumors and germ-line mutations*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(10): p. 1054-6.
63. Ni, Y., et al., *Germline mutations and variants in the succinate dehydrogenase genes in Cowden and Cowden-like syndromes*. *Am J Hum Genet*, 2008. **83**(2): p. 261-8.
64. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway*. *Am J Hum Genet*, 2001. **69**(6): p. 1186-97.
65. Lemarie, A. and S. Grimm, *Mutations in the heme b-binding residue of SDHC inhibit assembly of respiratory chain complex II in mammalian cells*. *Mitochondrion*, 2009. **9**(4): p. 254-60.
66. Baysal, B.E., et al., *A high-resolution integrated map spanning the SDHD gene at 11q23: a 1.1-Mb BAC contig, a partial transcript map and 15 new repeat polymorphisms in a tumour-suppressor region*. *Eur J Hum Genet*, 2001. **9**(2): p. 121-9.
67. Burnichon, N., et al., *The succinate dehydrogenase genetic testing in a large prospective series of patients with paragangliomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(8): p. 2817-27.
68. Pigny, P., et al., *Paraganglioma after maternal transmission of a succinate dehydrogenase gene mutation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(5): p. 1609-15.

69. Neumann, H.P. and Z. Erlic, *Maternal transmission of symptomatic disease with SDHD mutation: fact or fiction?* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(5): p. 1573-5.
70. van Baars, F., et al., *Familial non-chromaffinic paragangliomas (glomus tumors) : clinical aspects.* Laryngoscope, 1981. **91**(6): p. 988-96.
71. Guzy, R.D., et al., *Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 718-31.
72. Pasini, B., et al., *Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD.* Eur J Hum Genet, 2008. **16**(1): p. 79-88.
73. Schiavi, F., et al., *Predictors and prevalence of paraganglioma syndrome associated with mutations of the SDHC gene.* JAMA, 2005. **294**(16): p. 2057-63.
74. Mannelli, M., et al., *Genetic screening for pheochromocytoma: should SDHC gene analysis be included?* J Med Genet, 2007. **44**(9): p. 586-587.
75. Fakhry, N., et al., *Cervical paragangliomas: is SDH genetic analysis systematically required?* Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008. **265**(5): p. 557-63.
76. Pigny, P., et al., *Should genetic testing be performed in each patient with sporadic pheochromocytoma at presentation?* Eur J Endocrinol, 2009. **160**(2): p. 227-31.
77. Neumann, H.P., et al., *Clinical predictors for germline mutations in head and neck paraganglioma patients: cost reduction strategy in genetic diagnostic process as fall-out.* Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3650-6.
78. Vanharanta, S., et al., *Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma.* Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 153-9.
79. Ricketts, C., et al., *Germline SDHB mutations and familial renal cell carcinoma.* J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(17): p. 1260-2.
80. Cascon, A., et al., *Gross SDHB deletions in patients with paraganglioma detected by multiplex PCR: a possible hot spot?* Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(3): p. 213-9.
81. Mannelli, M., et al., *Clinically guided genetic screening in a large cohort of Italian patients with pheochromocytomas and/or functional or non-functional paragangliomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2009.
82. Timmers, H.J., et al., *Mutations associated with succinate dehydrogenase D-related malignant paragangliomas.* Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(4): p. 561-6.
83. Yeh, I.T., et al., *A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors.* Hum Genet, 2008. **124**(3): p. 279-85.
84. Schlisio, S., et al., *The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor.* Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 884-93.
85. Ferner, R.E., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1.* J Med Genet, 2007. **44**(2): p. 81-8.

86. Langer, P., et al., *Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1*. World J Surg, 2002. **26**(8): p. 891-6.
87. Schussheim, D.H., et al., *Multiple endocrine neoplasia type 1: new clinical and basic findings*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(4): p. 173-8.
88. Pasini, B., et al., *Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD*. Eur J Hum Genet, 2007.
89. Matyakhina, L., et al., *Genetics of carney triad: recurrent losses at chromosome 1 but lack of germline mutations in genes associated with paragangliomas and gastrointestinal stromal tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(8): p. 2938-43.
90. Dannenberg, H., et al., *Losses of chromosomes 1p and 3q are early genetic events in the development of sporadic pheochromocytomas*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 353-9.
91. Cascon, A., et al., *A novel candidate region linked to development of both pheochromocytoma and head/neck paraganglioma*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(3): p. 260-8.
92. Hofstra, R.M., et al., *Extensive mutation scanning of RET in sporadic medullary thyroid carcinoma and of RET and VHL in sporadic pheochromocytoma reveals involvement of these genes in only a minority of cases*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(8): p. 2881-4.
93. Cascon, A., et al., *Genetic and epigenetic profile of sporadic pheochromocytomas*. J Med Genet, 2004. **41**(3): p. e30.
94. Benn, D.E., et al., *Novel succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations in familial phaeochromocytomas and paragangliomas, but an absence of somatic SDHB mutations in sporadic phaeochromocytomas*. Oncogene, 2003. **22**(9): p. 1358-64.
95. Astuti, D., et al., *Investigation of the role of SDHB inactivation in sporadic phaeochromocytoma and neuroblastoma*. Br J Cancer, 2004. **91**(10): p. 1835-41.
96. Favier, J., et al., *The warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7094.
97. Dahia, P.L., et al., *Novel pheochromocytoma susceptibility loci identified by integrative genomics*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9651-8.
98. Thouennon, E., et al., *Identification of potential gene markers and insights into the pathophysiology of pheochromocytoma malignancy*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4865-72.
99. Brouwers, F.M., et al., *Gene expression profiling of benign and malignant pheochromocytoma*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1073**: p. 541-56.
100. Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 3 v.
101. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(12): p. e57.
102. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics, 2005. **21**(2): p. 263-5.

103. Ritchie, M.E., et al., *A comparison of background correction methods for two-colour microarrays*. Bioinformatics, 2007. **23**(20): p. 2700-7.
104. Smyth, G.K., J. Michaud, and H.S. Scott, *Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments*. Bioinformatics, 2005. **21**(9): p. 2067-75.
105. Herrero, J., et al., *GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3461-7.
106. Monti, S., et al., *Consensus Clustering: A Resampling-Based Method for Class Discovery and Visualization of Gene Expression Microarray Data*. Machine Learning, 2003. **52**: p. 91-118.
107. Benita, Y., et al., *An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(14): p. 4587-602.
108. Morrissey, E.R. and R. Diaz-Uriarte, *Pomelo II: finding differentially expressed genes*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W581-6.
109. Benjamini, Y., et al., *Controlling the false discovery rate in behavior genetics research*. Behav Brain Res, 2001. **125**(1-2): p. 279-84.
110. Mootha, V.K., et al., *PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 267-73.
111. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
112. Alibes, A., et al., *Asterias: A Parallelized Web-based Suite for the Analysis of Expression and aCGH Data*. Cancer Inform, 2007. **3**: p. 1-9.
113. Brown, M.P., et al., *Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 262-7.
114. Nei, M., F. Tajima, and Y. Tateno, *Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data*. J Mol Evol, 1983. **19**(2): p. 153-70.
115. Geli, J., et al., *The Ras effectors NORE1A and RASSF1A are frequently inactivated in pheochromocytoma and abdominal paraganglioma*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(1): p. 125-34.
116. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
117. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
118. Soilleux, E.J., et al., *Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues*. Histopathology, 2005. **47**(6): p. 602-10.
119. Appelhoff, R.J., et al., *Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38458-65.
120. Jacobs, T.W., et al., *Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug*

- Administration-approved scoring system. J Clin Oncol*, 1999. **17**(7): p. 1983-7.
121. Amar, L., et al., *Changes in urinary total metanephrine excretion in recurrent and malignant pheochromocytomas and secreting paragangliomas*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1073**: p. 383-91.
122. Ricketts, C.J., et al., *Tumour Risks and Genotype-Phenotype-Proteotype Analysis in 358 Patients with Germline Mutations in SDHB and SDHD*. *Hum Mutat*, 2009.
123. Timmers, H.J., et al., *Clinical presentations, biochemical phenotypes, and genotype-phenotype correlations in patients with succinate dehydrogenase subunit B-associated pheochromocytomas and paragangliomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 779-86.
124. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5615-21.
125. Benn, D.E., et al., *Clinical presentation and penetrance of Pheochromocytoma/ Paraganglioma syndromes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005.
126. Klein, R.D., et al., *Germline SDHB mutations are common in patients with apparently sporadic sympathetic paragangliomas*. *Diagn Mol Pathol*, 2008. **17**(2): p. 94-100.
127. Benn, D.E., et al., *Genetic testing in pheochromocytoma- and paraganglioma-associated syndromes*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1073**: p. 104-11.
128. Taschner, P.E., et al., *Nearly all hereditary paragangliomas in the Netherlands are caused by two founder mutations in the SDHD gene*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **31**(3): p. 274-81.
129. Cascon, A., et al., *Molecular characterisation of a common SDHB deletion in paraganglioma patients*. *J Med Genet*, 2008. **45**(4): p. 233-8.
130. Peczkowska, M., et al., *Impact of screening kindreds for SDHD p.Cys11X as a common mutation associated with paraganglioma syndrome type 1*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(12): p. 4818-25.
131. Bayley, J.P., et al., *The first Dutch SDHB founder deletion in paraganglioma-pheochromocytoma patients*. *BMC Med Genet*, 2009. **10**: p. 34.
132. Persu, A., et al., *High prevalence of SDHB mutations in head and neck paraganglioma in Belgium*. *J Hypertens*, 2008. **26**(7): p. 1395-1401.
133. Galera-Ruiz, H., et al., *W43X SDHD mutation in sporadic head and neck paraganglioma*. *Anal Quant Cytol Histol*, 2008. **30**(2): p. 119-23.
134. Cascon, A., et al., *Rationalization of Genetic Testing in Patients with Apparently Sporadic Pheochromocytoma/Paraganglioma*. *Horm Metab Res*, 2009.
135. Lopez-Jimenez, E., et al., *SDHC mutation in an elderly patient without familial antecedents*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008. **69**(6): p. 906-10.
136. Erlic, Z., et al., *Clinical predictors and algorithm for the genetic diagnosis of pheochromocytoma patients*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(20): p. 6378-85.
137. Johannessen, C.M., et al., *The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8573-8.

138. Gustafsson, M.V., et al., *Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state*. Dev Cell, 2005. **9**(5): p. 617-28.
139. Maranchie, J.K. and Y. Zhan, *Nox4 is critical for hypoxia-inducible factor 2-alpha transcriptional activity in von Hippel-Lindau-deficient renal cell carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9190-3.
140. Pollard, P.J., et al., *Expression of HIF-1alpha, HIF-2alpha (EPAS1), and their target genes in paraganglioma and pheochromocytoma with VHL and SDH mutations*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4593-8.
141. Raval, R.R., et al., *Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(13): p. 5675-86.
142. Adjalle, R., et al., *Treatment of malignant pheochromocytoma*. Horm Metab Res, 2009. **41**(9): p. 687-96.
143. Brouwers, F.M., et al., *High frequency of SDHB germline mutations in patients with malignant catecholamine-producing paragangliomas: implications for genetic testing*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4505-9.
144. Chen, C., et al., *Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9519-25.
145. Lee, C.M., et al., *VHL Type 2B gene mutation moderates HIF dosage in vitro and in vivo*. Oncogene, 2009. **28**(14): p. 1694-705.
146. Aprelikova, O., et al., *Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors*. J Cell Biochem, 2004. **92**(3): p. 491-501.
147. Kaelin, W.G., Jr., *The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 627-38.
148. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
149. Berra, E., et al., *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia*. Embo J, 2003. **22**(16): p. 4082-90.
150. Fu, J., et al., *EGLN3 prolyl hydroxylase regulates skeletal muscle differentiation and myogenin protein stability*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 12410-8.
151. Sato, E., et al., *Identification of an immunogenic CTL epitope of HIFPH3 for immunotherapy of renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6916-23.
152. Hatzimichael, E., et al., *The prolyl-hydroxylase EGLN3 and not EGLN1 is inactivated by methylation in plasma cell neoplasia*. Eur J Haematol, 2009.
153. Kothari, S., et al., *BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF*. Oncogene, 2003. **22**(30): p. 4734-44.
154. Fei, P., et al., *Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth*. Cancer Cell, 2004. **6**(6): p. 597-609.
155. Kaelin, W.G., Jr., *SDH5 mutations and familial paraganglioma: somewhere Warburg is smiling*. Cancer Cell, 2009. **16**(3): p. 180-2.

156. Tracy, K., et al., *BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6229-42.
157. Hensen, E.F., et al., *Similar gene expression profiles of sporadic, PGL2-, and SDHD-linked paragangliomas suggest a common pathway to tumorigenesis*. BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 25.
158. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Gen y exón	Nombre de los primers	Secuencia de los primers (5'→3')	Tamaño del amplicón para secuenciación (bp)	Condiciones de la PCR
VHL exón 1 ADN genómico	VHL_E1_F VHL_E1_R	GCCCGGGTGGTCTGGATC GATAGCACGGTCTGAAGCCC	400 bp (R)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 64 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
VHL exón 2 ADN genómico	VHL_E2_F VHL_E2_R	AGCCACCGGTGTGGCTCTTTA CCAGTTCTCAATTTTGCCTGATGT	271 pb (F/R)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
VHL exón 3 ADN genómico	VHL_E3_F VHL_E3_R	CCTTGTAAGAGCCCTAGTCTGTCACT CTTTTGATGGTACTGATGAGTCTTG	332 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 54 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
RET exón 10 ADN genómico	RET_E10_F RET_E10_R	TATGCTTGCGACACCAGTTG CAGCAATTTCTCCCTTGTT	310 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 64 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
RET exón 11 ADN genómico	RET_E11_F RET_E11_R	CAGAGCATACGCCAGCCTGTA CACAGACTGTCCCCACACAG	418 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x30 Elongación: 72 °C, 10'
RET exón 15 ADN genómico	RET_E15_F RET_E15_R	GTCTCACCAGGCCGCTAC TTGGGAAGCCTAGGAAAGATA	235 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 64 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
RET exón 16 ADN genómico	RET_E16_F RET_E16_R	GCCTGGCCTTCTCCTTTAC TAACCTCCACCCCAAGAGAG	135 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 1 ADN genómico	SDHB_E1_F SDHB_E1_R	CTCCCACTTGGTTGCTCG AGGGAAAAGTCAGGAAGGCC	244 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 54 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 2 ADN genómico	SDHB_E2_F SDHB_E2_R	GTGCCAACAAAATGGAATTA CACATCCTTGGGAGGCTTAA	300 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 3 ADN genómico	SDHB_E3_F SDHB_E3_R	ACATCCAGGTGTCTCCGATT CATTTCAATTCCTGTTGGGCT	200 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 4 ADN genómico	SDHB_E4_F SDHB_E4_R	CAGCAAGGAGGATCCAGAAG TGTTTTATTGTCATGGGGG	270 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 5 ADN genómico	SDHB_E5_F SDHB_E5_R	AAAGCTGAGGTGATGGGAA CTTGGCAGGGAACATAAGCT	270 pb (R)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 6 ADN genómico	SDHB_E6_F SDHB_E6_R	GTCTCTCCCGTCACAAGCTC GCATCCAGAAGTCCAAGAGG	210 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 7 ADN genómico	SDHB_E7_F SDHB_E7_R	SDHB_E7_F AGAGCTGACACGCCAGAAGT	240 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHB exón 8 ADN genómico	SDHB_E8_F SDHB_E8_R	TGAACACAGCTGAGGAAGGAG TTGGTTTTCCATGAATACAGCA	275 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHC exón 1 ADN genómico	SDHC_E1_F SDHC_E1_R	GTCACATGACACCCCCAAC GACTTCAGTGGGACTGGGAG	120 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHC exón 2 ADN genómico	SDHC_E2_F SDHC_E2_R	TCTATCCCTTCACCCCTAAAAA TTTTGAGACGGAGTCTCGCT	180 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 54 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHC exón 3 ADN genómico	SDHC_E3_F SDHC_E3_R	GATTACAGGCCTGAGCAACC AGGAAGGATTCTGGAGCCAG	210 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHC exón 4 ADN genómico	SDHC_E4_F SDHC_E4_R	TTCTTTTTAAAAATTGCTTTGTGTG TAGTCTCCGCCTCCTTTGAA	150 pb (R)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHC exón 5 ADN genómico	SDHC_E5_F SDHC_E5_R	CAGGGGTCCAGTTTTATGT TCGGGATTGACACATTTTCT	240 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHC exón 6 ADN genómico	SDHC_E6_F SDHC_E6_R	TTTTTTTTTGCTTTGTCCA ATTCTTATCTCCAGGCTGG	220 pb (R)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHD exón 1 ADN genómico	SDHD_E1_F SDHD_E1_R	ATTGTGCGCTAAGTGGTTCC GTGCTTAGCGTAGCCTCCAG	270 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHD exón 2 ADN genómico	SDHD_E2_F SDHD_E2_R	TCAGTCCTGTTAAAGGAGAGGTTCC CTGCTGCTTTCTGGGCTCTA	300 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHD exón 3 ADN genómico	SDHD_E3_F SDHD_E3_R	TTTGGGTTACTGTGTGGCATA CGCTCAGTTTGTGTGTGTA	200 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'
SDHD exón 4 ADN genómico	SDHD_E4_F SDHD_E4_R	GTCTTCTAATTTCACTGTGGTTTTT CCTTTTGACTTCATACCTTTGAA	270 pb (F)	Desnaturalización: 95 °C, 5'; Ciclos: (95°C, 30"; 62 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (95°C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25 Elongación: 72 °C, 10'

Tabla 1MS. Condiciones de las PCRs realizadas para la caracterización molecular realizada tanto de los pacientes como de los tumores.

Primers	Secuencia 5'-->3'
SDHB-1F	CCCTTTCTGAGAAGGTCACG
SDHB-1R	GGCTTTCCCTGACTTTTCCCT
SDHB-2F	TTGAATGCCTGCCTTTTCTAA
SDHB-2R	AAACAGAGCCATCGGATGAT
SDHB-3F	ACATCCAGGTGTCTCCGATT
SDHB-3R	AGCCCAACAGGAATGAAATG
SDHB-4F	CAGCAAGGAGGATCCAGAAG
SDHB-4R	CCCCCATGCAAATAAAACA
SDHB-5F	CAGTGTCCAAGAAATGGGGTA
SDHB-5R	TGCCAGTTCCTCTCCAGAAT
SDHB-6F	ATGCACTGACCCCAAGGTA
SDHB-6R	CCCAGATTACCGAAAGCAA
SDHB-7F	AGTGAATTCCCTTTCTCTGC
SDHB-7R	TAGGGTTGCTCTCTGCCAAT
SDHB-8F	TGAACCAGCTGAGGAAGGAG
SDHB-8R	TGCTGTATTCATGGAACCAA
SDHC-1F	GTCCATGACACCCCAAC
SDHC-1R	CTCCCAGTCCCAGTGAAGTC
SDHC-2F	GAAAATGGTATCAAGGACACT
SDHC-2R	AGTCCCAGCTACTCAGGAG
SDHC-3F	GATTACAGCCCTGAGCAACC
SDHC-3R	CTGGCTCCAGAATCCTTCT
SDHC-4F	TTCTTTTAAATTTGTCTTGTGTG
SDHC-4R	TTCAAAGGAGGCGGAGACTA
SDHC-5F	CAGGGGTCCCAGTTTATGT
SDHC-5R	AGAAAATGTGCAATCCCGA
SDHC-6F	TAAAGGTGGGGCATAAGG
SDHC-6R	AGAAACAGGGGAAACTAGA
SDHD-1F	ATTGTCGCCTAAGTGGTTCC
SDHD-1R	CTGGAGGCTACGCTAAGCAC
SDHD-2F	TCAGTCCTGTAAAGGAGAGGTTT
SDHD-2R	TAGAGCCCAGAAAGCAGCAG
SDHD-3F	TTTGGGTACTGTGTGGCATA
SDHD-3R	CACAGCAAACAACTGAGCA
SDHD-4F	GTCTTCTAATTTCACTGTGGTTTT
SDHD-4R	TTCAAAGTATGAAGTCAAAAGGTC
Confirmación	Secuencia 5'-->3'
SDHB-1AF	AGTGGGTCCCTCAGTGGATGT
SDHB-1AR	ATCAGCTCCAGGCAGTCTCT
SDHB-1BF	CTCCGCCCCATCTAAGTCT
SDHB-1BR	TCTCTGAGGCTCCAGGACTC

Tabla 2MS. Secuencia de primers empleados en la PCR-Multiplex. En azul se muestran primers alternativos utilizados en el caso del exón 1 de *SDHB*.

Gen Analizado	Código Sonda Roche
BNIP3	#22
NPNT	#82
SLC2A1	#67
SLC16A3	#18
JAKMIP1	#29
SPOCK2	#88
EGLN3	#61
GFRA2	#34
CDH10	#37
HPRT	#22

Tabla 3MS. Genes validados mediante RT-qPCR y sus correspondientes sondas de la Librería de Roche.

ID Tumor	Procedencia	Sexo	Edad	Localización	Estatus Genético	Mutación	Malignidad
1	España	H	45	Adrenal	SP	-	No
2	España	H	66	Adrenal	SP	-	No
3	Italia	H	15	Adrenal	VHL (S)	c.482G>A	No
4	España	H	64	Adrenal	SP	-	No
8	España	H	34	Adrenal	RET	c.1853G>T	No
9	España	M	61	Carotideo	SP	-	No
10	España	M	78	Abdominal	SP	-	No
11	España	M	46	Adrenal	SP	-	No
12	España	H	12	Adrenal	VHL	c.523T>A	No
13	España	M	31	Adrenal	VHL	c.491A>G	No
14	España	H	25	Adrenal	VHL (S)	c.250G>T	No
15	España	H	40	Adrenal	SP	-	No
16	España	H	22	Adrenal	SDHB	c.689 G>A	No
17	España	H	76	Abdominal	SP	-	No
18	España	M	43	Adrenal	SP	-	No
19	España	H	13	Torácico	SDHB	c.166_170delCCTCA	Sí
20	España	H	62	Adrenal	SP	-	No
21	España	M	69	Jugular	SP	-	No
22	España	M	49	Cauda equina	SP	-	No
23	España	H	47	Adrenal	SP	-	No
24	España	H	52	Abdominal	SDHB	c.591delC	No
25	España	H	61	Adrenal	RET	c.1900T>C	No
26	España	H	79	Adrenal	SP	-	No
27	España	H	52	Adrenal	RET	c.1852T>G	No
28	España	M	53	Abdominal	SP	-	No
29	España	M	11	Torácico	SDHB	c.644delC	No
30	España	H	36	Adrenal	RET	c.1900T>C	No
31	España	H	17	Adrenal	VHL	c.482G>A	No
32	Italia	M	31	Adrenal	RET	c.1901G>A	No
33	España	H	-	Adrenal	RET (S)	c.2753T>C	No
34	España	M	20	Carotideo	SDHD	c.64C>T	No
35	España	H	11	Adrenal	VHL	c.472C>G	No
36	Italia	M	48	Adrenal	NF1	?	No
37	España	M	17	Carotideo	SDHD	c.64C>T	No
38	España	M	<18	Adrenal	VHL	c.482G>A	No
39	España	H	61	Cauda equina	SP	-	No
40	España	H	60	Jugular	SDHC	c.405insTTT	No
41	Italia	M	24	Adrenal	RET	c.1901G>C	No
42	Italia	M	24	Adrenal	VHL	c.500G>A	No
43	Italia	M	29	Adrenal	RET	c.1901G>C	No
46	España	H	48	Carotideo	SP	-	No
47	España	H	76	Abdominal	SP	-	No
48	España	M	67	Adrenal	SP	-	No
49	España	M	39	Adrenal	RET	c.1900T>C	No
50	Brasil	M	24	Adrenal	SDHB	c.1-10413_73-3866del	Sí
51	España	H	36	Adrenal	SP	-	No
52	España	H	37	Adrenal	VHL (S)	c.482G>A	No
53	España	H	70	Adrenal	SP	-	No
54	España	M	70	Adrenal	SP	-	No
55	España	H	14	Torácico	SDHB	c.1-10413_73-3866del	No
56	España	M	47	Adrenal	VHL	c.500G>A	No
57	Italia	H	32	Adrenal	FPCC	-	Sí
58	Italia	H	10	Adrenal	SP	-	No
59	Italia	M	34	Adrenal	TMEM127	IVS2-1A>C	No
60	Italia	M	54	Adrenal	TMEM127	IVS3-1G>A	No
61	Italia	H	45	Adrenal	RET	c.1901G>A	No
62	Italia	M	37	Adrenal	SP	-	No
63	Italia	M	30	Adrenal	VHL	c.500G>A	No
64	Italia	M	14	Carotideo	SDHD	c.341G>C	No
65	Italia	M	60	Adrenal	SP	-	Sí
66	Italia	H	30	Adrenal	VHL	c.256C>T	No
67	Italia	M	21	Carotideo	SDHD	c.341G>C	No
68	Italia	H	36	Adrenal	VHL	c.277G>C	No
69	España	M	32	Torácico	SDHB	c.166_170delCCTCA	No
71	Italia	M	47	Adrenal	FPCC	-	No
72	Italia	M	13	Adrenal	VHL (S)	c.482G>A	No
73	Italia	H	34	Adrenal	RET	c.2753T>C	No
74	Italia	M	24	Adrenal	RET	c.1900T>C	No
75	Italia	M	46	Adrenal	FPCC	-	Sí
76	Italia	M	18	Adrenal	RET	c.2753T>C	No
77	Italia	M	38	Adrenal	NF1	c.1062+2 C>T	No
78	Italia	M	21	Adrenal	RET	c.1826 G>C	No
79	Italia	H	45	Adrenal	RET	c.1900T>C	No
80	España	H	-	Adrenal	VHL	c.500G>A	No
81	España	M	-	Abdominal	SDHB	c.166_170delCCTCA	Sí
82	Italia	H	-	Adrenal	FPCC	-	No
83	España	M	44	Adrenal	SP	-	No
84	España	M	58	PCC	NF1	?	No
85	España	M	48	Adrenal	SP	-	No
86	España	H	49	Carotideo	SP	-	No
87	España	-	-	PCC	NF1	?	No
88	España	M	32	Abdominal	SP	-	No
89	España	M	-	Adrenal	SP	-	No
90	España	M	-	Carotideo	SP	-	No
5	España	-	-	Tejido Normal Adrenal	Normal	-	-
6	España	-	-	Tejido Normal Adrenal	Normal	-	-
7	España	-	-	Tejido Normal Adrenal	Normal	-	-
44	Italia	-	-	Tejido Normal Adrenal	Normal	-	-
45	Italia	-	-	Tejido Normal Adrenal	Normal	-	-
70	Italia	-	-	Tejido Normal Medular	Normal	-	-

(S): somático. ?: diagnóstico clínico.

Tabla 3bMS. Datos clínicos y status genético de los tumores hibridados en el estudio de perfiles de expresión.

Gene Name	unadj.p	FDR_indep
A_23_P259707_RP11-35N6.1	0.006	0.475
A_23_P327462_RFXDC1	0.014	0.475
A_23_P41789_SLC27A6	0.017	0.475
A_23_P70387_APOBEC2	0.017	0.475
A_23_P102611_WISP2	0.019	0.475
A_24_P409971_NEXN	0.019	0.475
A_24_P213884_TNXB	0.020	0.475
A_32_P77742_THC2338229	0.021	0.475
A_32_P229618_DLG2	0.023	0.475
A_24_P99244_FGF7	0.024	0.475
A_32_P61074_A_32_P61074	0.024	0.475
A_23_P69537_NMU	0.025	0.475
A_24_P522998_C1orf173	0.025	0.475
A_24_P349788_ENST00000325814	0.025	0.475
A_24_P44916_CDC42EP5	0.025	0.475
A_24_P923765_RKHD1	0.025	0.475
A_24_P187218_PCDH9	0.026	0.475
A_23_P97652_GPR153	0.026	0.475
A_24_P714316_A_24_P714316	0.026	0.475
A_24_P173294_KLF16	0.026	0.475
A_23_P138910_DDX25	0.026	0.475
A_32_P231880_A_32_P231880	0.026	0.475
A_23_P401524_COX6A2	0.027	0.475
A_23_P31453_STEAP1	0.027	0.475
A_23_P372962_A2ML1	0.027	0.475
A_24_P109432_ENST00000339968	0.027	0.475
A_24_P37887_GPR150	0.027	0.475
A_23_P39955_ACTG2	0.028	0.475
A_23_P21570_NPAS3	0.028	0.475
A_23_P333129_LOC440013	0.028	0.475
A_23_P257164_AMT	0.028	0.475
A_32_P133916_BNC2	0.028	0.475
A_24_P226332_ENST00000369303	0.028	0.475
A_32_P233211_A_32_P233211	0.029	0.475
A_24_P317450_LOC202459	0.029	0.475
A_24_P918875_THC2400529	0.029	0.475
A_24_P42107_A_24_P42107	0.029	0.475
A_24_P235098_FOXQ1	0.030	0.475
A_23_P86493_LBX1	0.030	0.475
A_23_P107394_HES7	0.030	0.475
A_24_P48522_FLJ10490	0.030	0.475
A_24_P218074_ZNF467	0.030	0.475
A_32_P1291_A_32_P1291	0.030	0.475
A_23_P60146_PDGFRL	0.030	0.475
A_24_P399871_CACNA1I	0.031	0.475
A_32_P101073_A_32_P101073	0.031	0.475
A_24_P168581_GNAS	0.031	0.475
A_32_P150928_HS2ST1	0.031	0.475
A_24_P780709_A_24_P780709	0.032	0.475
A_32_P15887_A_32_P15887	0.032	0.475

Tabla 4MS. Lista de los 50 clones con menor p-val procedentes de la comparación realizada con Pomelo II de las clases SDHC/D *versus* SP de cabeza y cuello (p-val<0,05).

BIOCARTA	NES	NOM p-val
PTC1PATHWAY	1.560	0.029
WNTPATHWAY	-1.747	0.000
PYK2PATHWAY	-1.603	0.008
AKTPATHWAY	-1.405	0.013
IGF1MTORPATHWAY	-1.417	0.027
RAC1PATHWAY	-1.323	0.028
NGFPATHWAY	-1.468	0.034
TPOPATHWAY	-1.490	0.037
MTORPATHWAY	-1.492	0.038
GPCRPATHWAY	-1.326	0.040
PDGFPATHWAY	-1.468	0.047
MYOSINPATHWAY	-1.385	0.048
KEGG	NES	NOM p-val
POLUUNSATURATED_FATTY_ACID_BIOSYNTHESIS	-1.814	0.000
LINOLEIC_ACID_METABOLISM	-1.531	0.002
UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS	-1.543	0.017
WNT_SIGNALING_PATHWAY	-1.364	0.020
RENAL_CELL_CARCINOMA	-1.442	0.022
TIGHT_JUNCTION	-1.357	0.034
INSULIN_SIGNALING_PATHWAY	-1.278	0.038

Tabla 5MS. Resultados de la comparación realizada con GSEA en las clases SDHC/D *versus* SP de cabeza y cuello. El signo negativo del NES significa enriquecimiento en la clase SP de cabeza y cuello.

BIOCARTA	NES	NOM p-val
ATRBRCAPATHWAY	1.918	0.002
PLK3PATHWAY	1.694	0.008
G2PATHWAY	1.773	0.011
ATMPATHWAY	1.74	0.013
PTC1PATHWAY	1.611	0.026
MALATEXPATHWAY	1.624	0.034
LEPTINPATHWAY	1.549	0.043
NOTCHPATHWAY	-1.589	0.002
PS1PATHWAY	-1.733	0.009
GATA3PATHWAY	-1.757	0.010
TH1TH2PATHWAY	-1.672	0.014
NO1PATHWAY	-1.646	0.022
41BBPATHWAY	-1.606	0.039
INFLAMPATHWAY	-1.621	0.042
KEGG	NES	NOM p-val
DNA_REPLICATION	1.822	0.002
BILE_ACID_BIOSYNTHESIS	1.874	0.006
RNA_POLYMERASE	1.594	0.008
ASCORBATE_AND_ALDARATE_METABOLISM	1.636	0.017
PYSIMIDINE_METABOLISM	1.642	0.019
FOLATE_BIOSYNTHESIS	1.586	0.027
TYROSINE_METABOLISM	1.568	0.039
FATTY_ACID_METABOLISM	1.714	0.040
LYSINE_DEGRADATION	1.605	0.040
CELL_CYCLE	1.632	0.043
3-CHLOROACRYLIC_ACID_DEGRADATION	1.582	0.045
PYRUVATE_METABOLISM	1.644	0.046
NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	-1.694	0.009
RENIN-ANGIOTENSIN_SYSTEM	-1.637	0.014
ECM-RECEPTOR_INTERACTION	-1.697	0.023
AXON_GUIDANCE	-1.496	0.039

Tabla 6MS. Resultados de GSEA para la comparación RET *vs.* SP del *cluster* RET/NF1. El signo positivo de NES indica enriquecimiento en la clase RET y el negativo indica enriquecimiento en la clase SP.

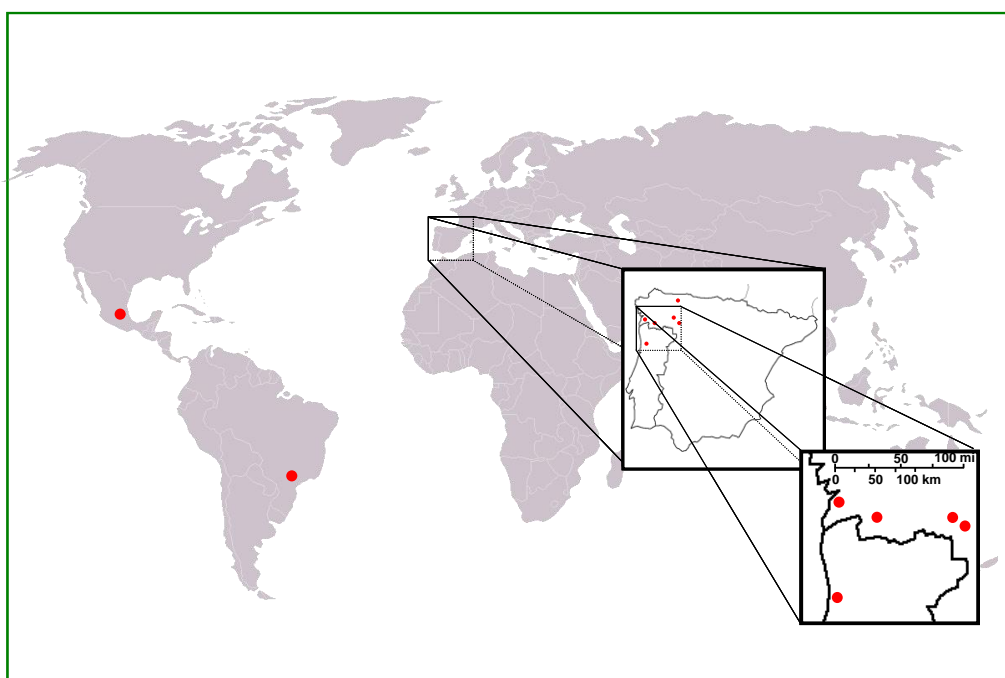


Figura 7MS. Mapa mostrando el origen geográfico de las 7 familias con delección del exón 1 de SDHB (c.1-10413_73-3866del) detectadas en nuestra serie de pacientes.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS
